

Université de Sherbrooke

**CARACTÉRISATION DU MÉCANISME DE RÉGULATION DE CDX2 PAR
LA MAP KINASE p38 ET IMPLICATION DE CDX2 DANS LA
DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES.**

Par

Sébastien Mongrain

Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des Sciences de la Santé

En vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

en Biologie Cellulaire

Membres du jury

Dr. Claude Asselin, programme de biologie cellulaire

Dr. François Boudreau, programme de biologie cellulaire

Dr. Sylvain Guérin, laboratoire d'endocrinologie moléculaire et oncologie, CHUL

Dre Nathalie Rivard, programme de biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada

11 septembre 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-26024-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-26024-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des Matières

TABLE DES MATIÈRES	II
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
LISTE DES PUBLICATIONS	XIII
RÉSUMÉ.....	XIV
INTRODUCTION.....	1
1. Physiologie de l'intestin grêle	1
2. Anatomie	1
3. Histologie	2
4. Cellules épithéliales intestinales.....	4
5. Développement intestinal	7
6. La signalisation WNT.....	8
7. La signalisation du TGF- β et des BMPs	11
8. Les MAP kinases retrouvées au niveau de l'intestin.....	14
9. Les MAP kinases ERK1/2.....	16
10. Les MAP kinases p38.....	19
11. Facteurs de transcription Cdx.....	22
12. Rôle des protéines Cdx durant le développement intestinal.....	23
13. Cibles des facteurs de transcription Cdx	25
14. Objectifs du projet de recherche.....	26

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	27
1. Culture cellulaire	27
2. Plasmides et constructions.....	27
3. Mutagenèse dirigée.....	28
4. Surexpression des différentes constructions.....	34
5. Essais luciférases	35
6. Extraction des protéines nucléaires	36
7. Gel de rétention	37
8. Création des protéines de fusion GST	38
9. Production des différentes protéines de fusion GST	43
10. Essais de précipitation GST.....	45
11. Extraction des protéines totales	45
12. Immunobuvardage de type Western.....	46
13. Essais de phosphorylation <i>in vitro</i>	48
14. Préparation des constructions rétrovirales.....	48
15. Production des rétrovirus.....	49
16. Infections rétrovirales.....	50
17. Extraction des ARN totaux.....	51
18. Analyse par micropuces d'ADN	51
19. Transcription inverse suivie de PCR	52
20. Immunofluorescence	53
21. Purification des radeaux lipidiques.....	54
22. Dosage de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline	55

23. Analyse des résultats	55
RÉSULTATS	56
1. Les mutants S33A, S99A et S156A de Cdx3 présentent une activité transcriptionnelle réduite.	56
2. La sérine 156 de Cdx3 pourrait être un site de phosphorylation de la MAP kinase p38 α	58
3. Les acides aminés 61 à 76 de Cdx3 sont importants dans la liaison de la MAP kinase p38 α	60
4. La surexpression de Cdx3 dans la lignée IEC-6 induit une modulation au niveau de l'expression génique de ces cellules.	65
5. L'expression de Cdx3 entraîne une augmentation de l'adhésion des cellules IEC-6.	72
6. L'expression de la galectine-4 augmente selon le niveau de différenciation des cellules intestinales épithéliales.....	72
7. La galectine-4 est localisée uniformément dans les cellules IEC-CDX3.....	74
8. La galectine-4 est retrouvée dans les radeaux lipidiques des cellules IEC-6 surexprimant Cdx3 qui se différencient.....	74
DISCUSSION.....	81
1. La MAP kinase p38 α lie Cdx2 au niveau des acides aminés 61 à 76 et phosphoryle la sérine 156.....	81
2. Cdx2 et la différenciation épithéliale intestinale.	85
3. Croissance et homéostasie cellulaire	86
4. Métabolisme des lipides	89

5. Adhésion cellulaire.....	91
PERSPECTIVES ET CONCLUSION	95
REMERCIEMENTS.....	98
BIBLIOGRAPHIE	100

Liste des figures

Figure 1.	Morphologie de l'intestin grêle	3
Figure 2.	Axe crypte-villosité de l'intestin grêle	5
Figure 3.	La cascade d'activation des WNTs	9
Figure 4.	Les voies de signalisation du TGF- β	12
Figure 5.	Séquence d'activation des cascades de la signalisation des MAP kinases	15
Figure 6.	La cascade des MAP kinases ERK1/2.....	17
Figure 7.	La cascade des MAP kinases p38.....	20
Figure 8.	Technique de PCR par la méthode « Overlap Extension »	29
Figure 9.	Vecteur d'expression de Cdx3.....	30
Figure 10.	Liste des mutations site-spécifiques	32
Figure 11.	Vecteur de fusion pGEX 4T2	39
Figure 12.	Liste des mutants de délétion de la séquence codante de Cdx3	42
Figure 13.	Les mutants S33A, S99A et S156A de Cdx3 présentent une activité transcriptionnelle réduite	57
Figure 14.	L'addition de l'inhibiteur SB203580 diminue la phosphorylation de la région N-terminale de Cdx3	59
Figure 15.	Une mutation de la sérine 156 rend Cdx3 moins sensible à l'action de l'inhibiteur de la MAP kinase p38, le SB203580.....	61
Figure 16.	Comparaison entre les séquences de Cdx2.....	62

Figure 17.	Les acides aminés 61-76 sont importants pour l'activation transcriptionnelle médiée par Cdx3.....	64
Figure 18.	Cdx3 est exprimé dans les cellules IEC-6 infectées avec le vecteur rétroviral pBABECDX3	66
Figure 19.	Influence de Cdx3 sur l'expression génomique dans les cellules IEC-6	67
Figure 20.	L'expression de Cdx3 entraîne une augmentation de l'adhésion des cellules IEC-6	73
Figure 21.	Expression de la galectine-4 dans les cellules IEC-CDX3 et Caco-2 .	75
Figure 22.	La galectine-4 est localisée uniformément dans les cellules IEC-CDX3	76
Figure 23.	La différenciation des cellules IEC-CDX3 mène à une re-distribution de la galectine-4 dans les radeaux lipidiques.....	78
Figure 24.	La phosphatase alcaline se retrouve dans les radeaux lipidiques des cellules IEC-CDX3.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1.	Programme de PCR overlap extension.....	31
Tableau 2.	Préparation du gel de polyacrylamide	38
Tableau 3.	Liste des anticorps utilisés.....	47
Tableau 4.	Liste des gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6	69
Tableau 5.	Classification des gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6	70
Tableau 6.	Liste d'une sélection de gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6	71

Liste des abréviations

ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ATF2 :	activating transcription factor 2
AP-1 :	activating protein 1
APC :	adenomatous polyposis coli
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ASK1 :	apoptosis signal-regulated kinase-1
ATP :	adénosine triphosphate
BMP :	bone morphogenetic protein
BSA :	bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)
°C :	degré celsius
Caco-2 :	cellules d'adénocarcinome de côlon humain
Cdk :	cyclin-dependent kinase
Cdx :	caudal-related homeobox
C/EBP:	CCAAT/enhancer binding protein
CHOP:	C/EBP-homologous protein
CKI:	caséine kinase 1
Co-Smads:	common small mothers against DPP
Cox :	cyclooxygénase-2
CRD:	carbohydrate-recognition domain
CTP:	cytosine triphosphate

DMEM :	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO :	dimethyl sulfoxide
DSH:	Dishevelled
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	disodium éthylenediamine tétraacétate
ERK1 :	extracellular signal-regulated kinase 1
ERK2 :	extracellular signal-regulated kinase 2
FBS :	fetal bovine serum (sérum de bovin foetal)
GADD:	growth arrest and DNA-damage
GC-C :	guanyl cyclase C
Grb2:	growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 :	glycogen synthase kinase-3
GST :	glutathion S-transférase
GTP:	guanosine 5'-triphosphate
h :	heure
HBEGF :	heparin-binding EGF-like growth factor
HDL:	high density lipopoliprotein
HEK :	human embryonic kidney
HNF :	hepatocyte nuclear factor
IEC-6 :	cellules épithéliales intestinales cryptales de rat
IL:	interleukine
IPAL :	intestinal phospholipase A/lyso-phospholipase
IPTG :	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

JNK :	c-Jun N-terminal kinase
KLF4 :	Krüppel-like transcription factor
LBP :	lipopolysaccharide binding protein
LEF :	lymphoid-enhancing factor
LDL :	low density lipoproteins
LPH :	lactase phlorizin hydrolase
LPS :	lipopolysaccharide endotoxin
LRP :	leucine responsive regulatory protein
MAP :	mitogen-activated protein
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MAPKK :	mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKAP:	mitogen-activated protein kinase activated protein kinase
MEK:	mitogen-extracellular kinase
MH :	Mad-homologue
MK2:	MAPKAP kinase 2
MKK:	MAP kinase kinase
MKP:	mitogen-activated protein kinase phosphatase
Mom1:	modifier of min 1
MUC2 :	mucin 2
NF-κB :	nuclear factor of kappa B
NHE :	Na ⁺ -H ⁺ Exchanger
OPTI-MEM:	Optimum modified Eagle medium
³² P:	isotope phosphate 32

PBS:	tampon phosphate saline
p.c. :	post-coïtum
PCR :	polymerase chain reaction
PDX-1:	pancreatic duodenal homeobox-1
PFA :	paraformaldéhyde
PI3K :	phosphatidylinositol 3 kinase
PMSF :	fluorure de phénylméthylsulfonyl
pnpp :	para-nitrophényl phosphate
PP :	protéine phosphatase
PTEN :	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten
RPM :	rotation par minute
SAP :	stress-activated protein
SI :	sucrase-isomaltase
SIF1 :	sucrase-isomaltase footprint 1
SOS :	Son of sevenless
TAK1 :	TGF- β -activated kinase-1
TBE :	Tris-Borate
TCF :	T cell factor
TGF- β :	transforming growth factor beta
TGFBR2 :	TGF- β receptor type II
TNF- α :	tumor necrosis factor α
VLDL :	very low density lipopoliprotein
WNT:	wingless-type

Liste des publications

Gendron F.P., **Mongrain S.**, Laprise P., McMahon S., Dubois C.M., Blais M., Asselin C., et Rivard N. (2006) The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointes. Liver Physiol.*, 290 : G310-G318.

Boulanger J., Vezina A., **Mongrain S.**, Boudreau F., Perreault N., Auclair B.A., Laine J., Asselin C. et Rivard N. (2005) Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280 : 18095-18107.

Résumé

Les gènes Cdx encodent des facteurs de transcription possédant un rôle très important dans le développement et le maintien de l'épithélium intestinal. Cdx2 joue un rôle central dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Celui-ci permet d'activer l'expression de plusieurs enzymes digestifs et d'induire l'expression de protéines de jonctions cellulaires. Nous avons démontré que la MAP kinase p38 est impliquée dans le processus de différenciation, entre autres, en activant le facteur de transcription Cdx2. La MAP kinase p38 retrouvée dans le noyau des cellules différenciées lie et phosphoryle Cdx2. Un des objectifs de mon projet de recherche consistait à identifier le site de liaison de la MAP kinase p38 sur Cdx2 ainsi que son ou ses site(s) de phosphorylation. Premièrement, par la création de mutations site-spécifiques, nous avons identifié un site de phosphorylation par la MAP kinase p38 sur Cdx2 au niveau de la sérine 156. Deuxièmement, nous avons déterminé, par la création de mutants de délétion, que le site de liaison de la MAP kinase p38 sur Cdx2 se trouve entre les acides aminés 61 et 76 dans la portion N-terminale.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de Cdx2 dans la différenciation épithéliale intestinale, nous avons surexprimé de manière stable Cdx3 dans la lignée cellulaire épithéliale intestinale IEC-6. La surexpression de Cdx3 mène à une meilleure adhésion cellulaire. Nous avons identifié plusieurs cibles de Cdx2 par analyse de micropuces d'ADN, entre autres, le gène de la galectine-4 qui est induit de 34.5 fois par Cdx2. La galectine-4 est une lectine capable de lier le β -lactose et de favoriser l'adhésion cellulaire puisqu'elle possède deux domaines CRD (carbohydate

recognition domain). Une autre caractéristique de la galectine-4 est qu'elle est retrouvée au niveau des radeaux lipidiques de la bordure en brosse dans les entérocytes, où elle permet leur stabilisation ainsi que le ciblage des radeaux lipidiques au niveau de la membrane apicale. Nous avons démontré que la cinétique d'expression de la galectine-4 suit parfaitement celle de Cdx2 dans la lignée Caco-2/15 provenant d'un adénocarcinome de côlon humain, et dans la lignée IEC-6 surexprimant Cdx3. Nous avons identifié la galectine-4 comme faisant partie des radeaux lipidiques des cellules surexprimant Cdx3, et que ces radeaux lipidiques contenant la galectine-4 sont plus spécialisés, avec la présence de la phosphatase alcaline. Ces résultats montrent que Cdx2 pourrait favoriser deux processus importants de la différenciation intestinale épithéliale, soit l'adhésion cellulaire et le développement de radeaux lipidiques spécialisés comme ceux retrouvés à la portion apicale des cellules différenciées par l'expression de la galectine-4.

Introduction

1. Physiologie de l'intestin grêle

L'intestin grêle est le siège principal de l'absorption des nutriments. Cette absorption est la résultante de flux permanents et abondants d'eau et de substances dissoutes de la lumière du tube digestif vers le milieu extracellulaire et vice-versa. Ces échanges à travers l'épithélium intestinal permettent en outre une régulation fine de l'équilibre du milieu intérieur.

2. Anatomie

L'intestin grêle est constitué du duodénum (30 cm), s'étendant du pylore à l'angle de Treitz, du jéjunum (3 à 4 mètres), et de l'iléon (environ 1 mètre) se terminant dans le côlon par la valvule iléocæcale. Le duodénum est le lieu où le chyme gastrique se mélange avec les sécrétions pancréatiques et biliaires. L'absorption se fait essentiellement par équilibration osmotique : elle est donc rapide et peu régulée, et intéresse surtout les glucides, l'eau et les électrolytes. Le jéjunum est le principal site d'absorption intestinale des glucides, des lipides et des protéines. C'est également à son niveau que se fait la majorité des mouvements hydrolytiques. L'absorption y est peu sélective. L'iléon est le siège d'absorption spécifique de la vitamine B12 ou celle des sels biliaires par exemple (Mion et Minaire, 1996).

3. Histologie

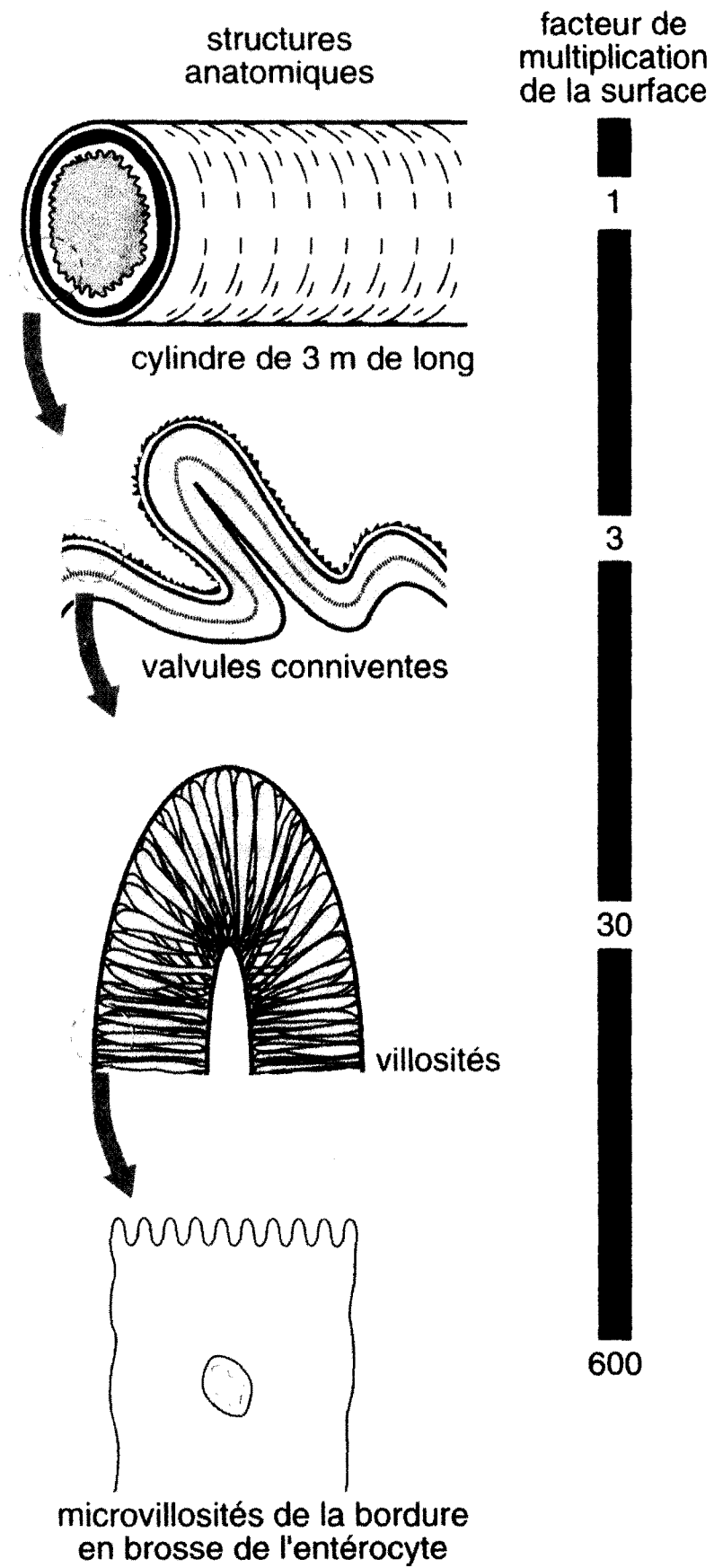
La grande capacité d'absorption de l'intestin grêle est liée à sa structure, que l'on peut représenter comme une superposition de plis de plus en plus petits. De ce fait, la surface d'absorption réelle est fortement augmentée. On décrit ainsi :

- a) les *valvules conniventes*, qui sont des replis transversaux de muqueuse intestinale de 1 à 2 cm de hauteur;
- b) Les *villosités intestinales*, qui sont des plis muqueux de 1 mm environ, plus nombreux dans le jéjunum que dans l'iléon. Ces villosités sont séparées par des cryptes, qui constituent la zone de germination des cellules intestinales. L'ensemble crypte-villosité forme l'unité fonctionnelle d'absorption.
- c) Les *microvillosités*, qui sont situées au pôle apical (luminal) de la cellule absorbante intestinale (entérocyte), constituent la bordure en brosse. Ces microvillosités sont recouvertes d'un matériau fibrillaire riche en glycoprotéines, le glycocalyx, qui joue un rôle de filtre du contenu intestinal et participe à la constitution d'une couche aqueuse non agitée.

La superposition des valvules, villosités et microvillosités multiplie la surface d'absorption par 600, pour aboutir à une surface totale d'échange d'environ 200 m² (Fig. 1). L'absorption globale est très dépendante des villosités. En effet, la malabsorption est toujours présente en cas d'atrophie villositaire (ou maladie coeliaque). En revanche, une résection de l'intestin grêle laissant en place plus d'un mètre de jéjunum permet une absorption quasiment normale des principaux nutriments (Mion et Minaire, 1996).

Figure 1 Morphologie de l'intestin grêle

Tirée du livre Physiologie Humaine 2^e édition, page 398.



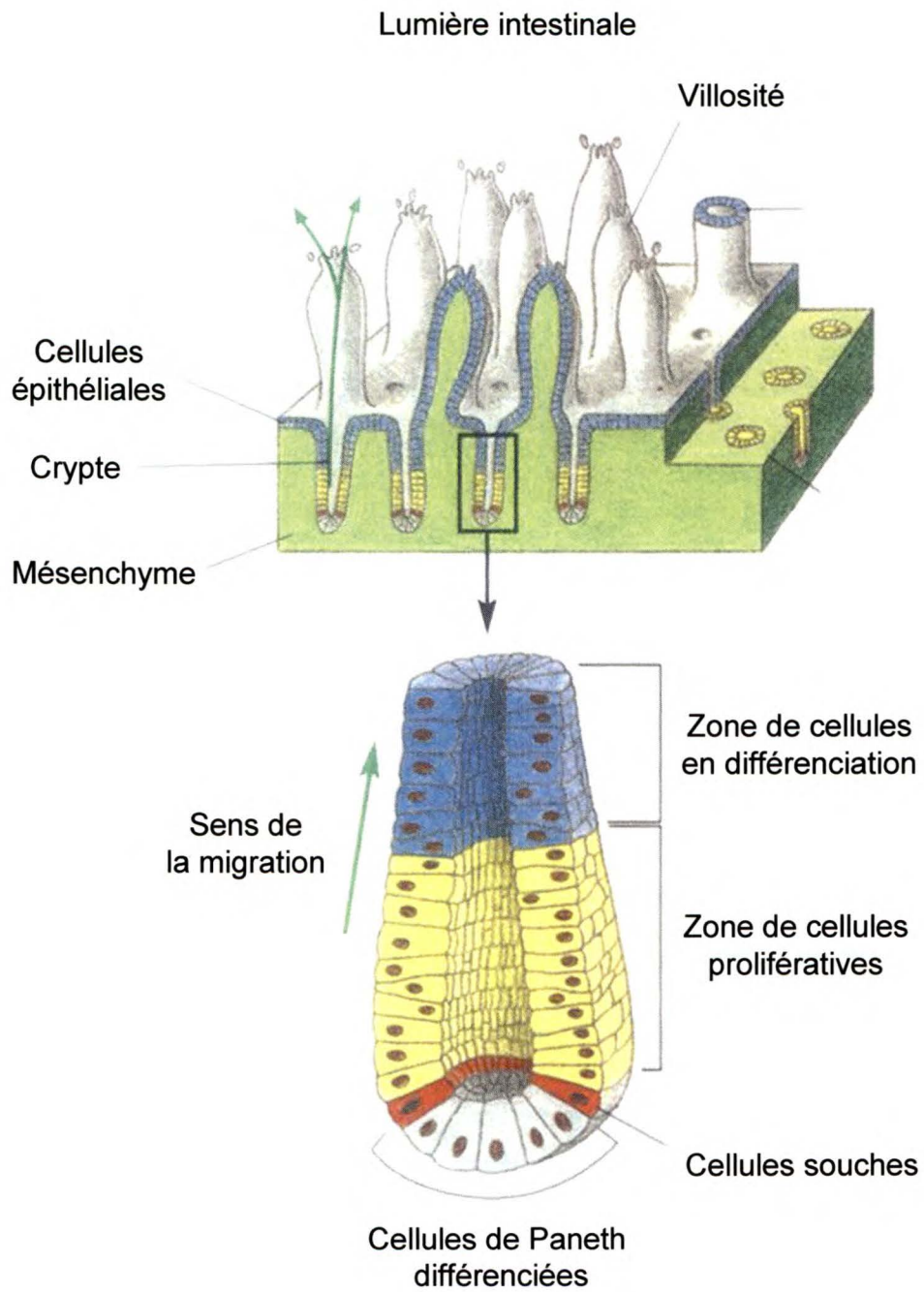
4. Cellules épithéliales intestinales

Les cellules épithéliales intestinales les plus nombreuses sont les cellules absorbantes ou entérocytes. Elles proviennent de cellules indifférenciées situées au niveau des cryptes, et se différencient lors de leur migration vers le haut des cryptes. Cette différenciation est surtout caractérisée par la polarisation de l'entérocyte : le pôle apical de la membrane plasmique est en effet constitué de microvillosités soutenues par une armature centrale de microfilaments d'actine et de myosine qui permet le mouvement. Cette bordure en brosse est riche en enzymes et en protéines de transport. La membrane basolatérale est pauvre en enzymes et contient des transporteurs différents de ceux de la membrane apicale (Mion et Minaire, 1996). Des jonctions serrées séparent les membranes apicales et basolatérales et servent de liaison entre les cellules, et de séparation entre la lumière intestinale et l'espace intercellulaire, procurant une résistance transépithéliale.

Le processus de renouvellement au niveau de l'intestin grêle a bien été étudié. L'épithélium de l'intestin grêle est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales (Fig 2). Les cellules souches sont retrouvées à la base des cryptes et possèdent le potentiel prolifératif de l'axe crypte-villosité. Elles ont la capacité de générer tous les types cellulaires retrouvés au niveau de l'axe crypte-villosité ainsi que de se multiplier pour demeurer en nombre constant. Celles-ci génèrent les quatre types de cellules différenciées soit : 1) les cellules absorbantes (entérocytes) qui sont retrouvées au niveau de la villosité, elles possèdent des microvillosités à leur pôle apical qui permettent d'augmenter la surface d'absorption, 2) les cellules à

Figure 2 Axe crypte-villosité de l'intestin grêle

Tirée et modifiée du livre Molecular Biology of the Cell 4^e édition,
page 1275.



caliciformes sécrètent du mucus qui forme une barrière protectrice à la surface des cellules de la villosité, 3) les cellules de Paneth font partie de la défense immunitaire et sécrètent les *cryptdines*, protéines de la famille des défensines, permettant de tuer les bactéries, et du lysozyme, enzyme spécialisé dans la dégradation des parois bactériennes, et 4) les cellules entéroendocrines qui sécrètent la sécrétine, la somatostatine, ainsi que des hormones peptidiques comme la cholécystokine, qui agit sur les neurones ainsi que sur d'autres types cellulaires de l'intestin pour permettre de contrôler la croissance, la prolifération et l'activité digestive de l'intestin (Edwards *et al.*, 2002).

Les cellules absorbantes, caliciformes et entéroendocrines migrent vers le haut de la villosité partant de la région où l'on retrouve les cellules souches, par un mouvement de glissement au niveau du feuillet épithélial pour couvrir toute la surface de la villosité (Edwards *et al.*, 2002). Les cellules précurseurs de l'épithélium, en cheminant pour migrer hors de la crypte, sont déjà prédestinées à se différencier. Elles procèdent à quatre ou six divisions rapides avant d'arrêter leur processus de division. Lorsqu'elles atteignent le tiers supérieur de la crypte, elles entament leur différenciation terminale. En seulement deux à cinq jours après leur sortie de la crypte, les cellules migrent jusqu'au bout de la villosité, où elles entament les étapes initiales de l'apoptose qui mène finalement à leur relâche dans la lumière intestinale (Kaestner *et al.*, 1997 ; Mutoh *et al.*, 1997 ; Korinek *et al.*, 1998 ; Pabst *et al.*, 1999 ; Clatworthy et Subramanian, 2001 ; Yang *et al.*, 2001 ; Beck, 2002). Les seules cellules échappant à ce processus sont les cellules souches et les cellules de Paneth

(Radtke et Clevers, 2005). Les cellules de Paneth sont produites en un plus petit nombre et possèdent un patron de migration différent. Celles-ci demeurent dans le bas des cryptes où elles sont continuellement remplacées, mais de manière plutôt lente (environ 20 jours) avant d'entreprendre un processus d'apoptose et d'être phagocytées par les cellules avoisinantes.

5. Développement intestinal

Le développement de l'intestin grêle et du côlon débute très rapidement durant l'embryogenèse. La cytodifférenciation de l'endoderme en épithélium intestinal se produit entre les jours 14 et 15 post-coïtum chez la souris et entre les semaines 8 et 10 chez l'humain. Les quatre types de cellules épithéliales, soit caliciformes, entéroendocrines, entérocytes/colonocytes et de Paneth se développent rapidement après cette transition. Le développement de l'épithélium colonique est retardé comparativement à celui de l'intestin grêle, mais les deux possèdent les mêmes caractéristiques (Guo *et al.*, 2004). Le développement de l'épithélium mature demande donc une expression spatiale et temporelle de nombreux produits de gènes pour diriger les changements nécessaires à l'organogenèse intestinale. Chez l'adulte, lorsque l'épithélium intestinal est mature et complètement développé, il demeure dans un stade constant de renouvellement. Ce renouvellement dépend d'un processus de prolifération des cellules souches hautement régulé et d'une différenciation des cellules filles (Gordon, 1989 ; Gordon *et al.*, 1992 ; Potten, 1997).

Deux voies de signalisation stimulées par des facteurs paracrines ont été démontrées comme étant importantes dans le développement, la prolifération et la différenciation cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal : les WNT ainsi que les TGF- β /BMP.




6. La signalisation WNT

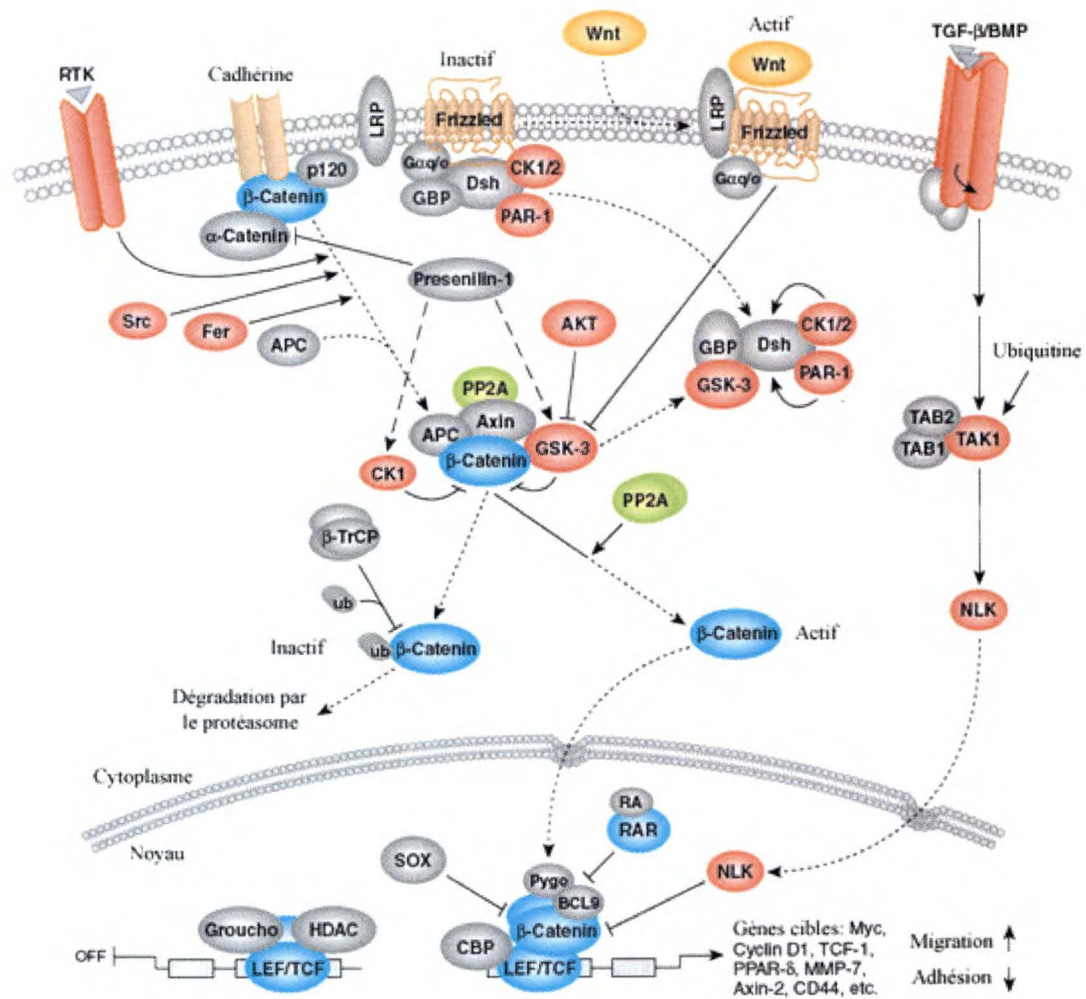
Les facteurs WNT sécrétés sont retrouvés à travers tout le règne animal (Cadigan et Nusse, 1997) et contrôlent virtuellement chaque décision développementale. Le joueur central de cette voie de signalisation est la β -caténine, une protéine cytoplasmique dont la stabilité est régulée par le complexe suppresseur de tumeur APC (Fig. 3). Le complexe comprenant la protéine transmembranaire à sept domaines Frizzled et LRP5/6, les homologues du récepteur LDL, constituent le récepteur des WNT sécrétés (Bienz et Clevers, 2000 ; Giles *et al.*, 2003).

Lorsque le complexe WNT et son récepteur n'est pas formé, 2 protéines d'échafaudages du complexe destructeur, APC et axin, lient la β -caténine nouvellement synthétisée. La CKI et la GSK3 β , 2 kinases présentes dans le complexe destructeur, phosphorylent de manière séquentielle une série conservée de sérines et de thréonines dans la partie amino terminale de la β -caténine, entraînant le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 qui dirige la β -caténine vers une dégradation au niveau du protéasome (Fig. 3). La présence de WNT au niveau de son récepteur inhibe l'activité kinase du complexe destructeur par un mécanisme encore mal compris qui implique l'interaction directe de l'axine avec LRP5/6, et/ou l'action d'une molécule liant l'actine, Dishevelled (DSH). Ceci a pour

Figure 3 La cascade d'activation des WNTs

Tiré et modifié du site www.cellsignal.com.

-  ⇒ Kinase
-  ⇒ Phosphatase
-  ⇒ Facteur de transcription



conséquence une stabilisation de la β -caténine et sa translocation au noyau où elle induit la liaison à l'ADN des protéines de la famille *T cell factor/lymphoid-enhancing factor* (TCF/LEF) (Reya et Clevers, 2005). En absence de la signalisation par les WNTs, ces protéines liant l'ADN occupent les promoteurs des gènes cibles et répriment la transcription. L'interaction avec la β -caténine convertit de façon transitoire les facteurs TCF en activateurs transcriptionnels, traduisant ainsi la signalisation des WNTs en activation transcriptionnelle des gènes cibles des facteurs TCF (Sancho *et al.*, 2004).

De multiples études *in vivo* ont démontré le rôle de la signalisation par les WNTs dans la prolifération des cellules précurseurs de l'épithélium intestinal (Kinzler et Vogelstein, 1996 ; Bienz et Clevers, 2000 ; Booth *et al.*, 2002). Premièrement, les cellules prolifératives au fond de la crypte de l'intestin grêle et du côlon accumulent la β -caténine au niveau de leurs noyaux. Deuxièmement, une mutation activant la voie des WNTs peut mener au développement d'un cancer colorectal chez l'humain, ainsi que la formation de polypes adénomateux au niveau de l'intestin de la souris. Troisièmement, l'inactivation de TCF4, un membre de la famille TCF/LEF spécifique à l'intestin, induit la perte du compartiment prolifératif au niveau de l'intestin grêle chez la souris (Korinek *et al.*, 1998). Quatrièmement, l'inhibition de l'activité β -caténine/TCF4 dans les cellules provenant de cancers colorectaux induit la différenciation cellulaire. Deux des gènes cibles de TCF4 qui méritent une attention spéciale sont les récepteurs EphB2 et EphB3 ou leur expression est (Batlle *et al.*, 2002). Ces protéines sont exprimées selon un gradient, avec l'expression la plus forte




au niveau de la crypte contrairement à leur ligand, l'éphrin-B1, qui possède un gradient inverse avec une expression plus faible au niveau de la crypte. La perte d'expression des récepteurs Eph mène à l'entremêlement des cellules prolifératives et différenciées. Dans les souris EphB3^{-/-}, les cellules de Paneth ne suivent plus leur processus de migration vers le bas de la crypte mais sont retrouvées tout le long de l'axe crypte-villosité (Sancho *et al.*, 2004).

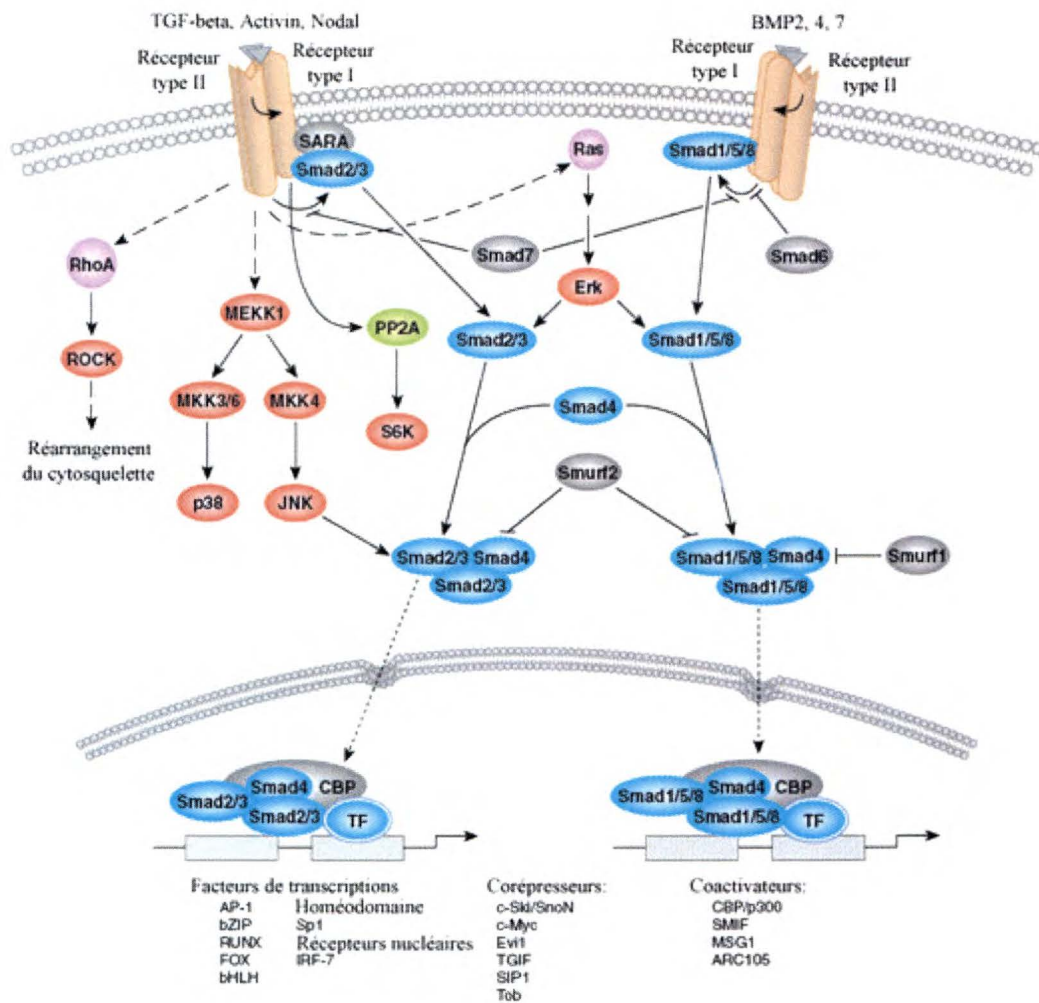
7. La signalisation du TGF- β et des BMPs

La superfamille de facteurs de croissance du TGF- β est impliquée dans la régulation de plusieurs processus biologiques dont le développement embryonnaire, la réparation de plaies, l'angiogénèse, la prolifération et la différenciation cellulaire (Blobe *et al.*, 2000 ; Shi et Massague, 2003). La famille du TGF- β comprend les TGF- β s, les activines et les bone morphogenetic proteins (BMPs) (Fig. 4). Ces protéines permettent une signalisation via des complexes hétérodimériques de récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinases (Derynck et Feng, 1997 ; Javelaud et Mauviel, 2004 ; ten Dijke et Hill, 2004). La liaison du ligand au récepteur primaire (type II), une kinase constitutivement active, permet le recrutement, la transphosphorylation et l'activation du récepteur de signalisation (type I). Ce dernier phosphoryle des médiateurs cytoplasmiques de la famille des Smad (R-Smad, Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8) (Derynck *et al.*, 1998 ; Miyazono *et al.*, 2000 ; Zimmerman et Padgett, 2000 ; Shi et Massague, 2003). Les Smad1, Smad5 et Smad8 sont des substrats des récepteurs des BMP, tandis que Smad2 et Smad3 sont activés par les récepteurs du TGF- β et des activines. Les R-Smads contiennent deux

Figure 4 Les voies de signalisation du TGF- β

Tiré et modifié du site www.cellsignal.com.

-  \Rightarrow Kinase
-  \Rightarrow Phosphatase
-  \Rightarrow Facteur de transcription



domaines conservés Mad-homologue (MH) qui forment une structure globulaire séparée par une région linker (Hill, 1999 ; Miyazono *et al.*, 2000 ; Shi et Massague, 2003). Le domaine N-terminal MH1 lie l'ADN tandis que le domaine MH2 C-terminal lie d'autres protéines. La phosphorylation des R-Smads par le récepteur de type I se produit principalement sur 2 sérines se trouvant à l'intérieur d'un motif conservé –SS(M/V)S- au niveau de la partie C-terminale. Suivant la phosphorylation, les Smads forment un complexe hétérodimérique avec Smad4, un médiateur commun de tous les sentiers Smads. L'hétérocomplexe Smad est par la suite transloqué au noyau où il active ses gènes cibles en liant l'ADN directement ou en s'associant avec d'autres facteurs de transcription (Derynck et Feng, 1997 ; Hill, 1999 ; Miyazono *et al.*, 2000 ; Shi et Massague, 2003 ; Javelaud et Mauviel, 2004 ; ten Dijke et Hill, 2004). Les membres du troisième groupe de Smads, les Smads inhibiteurs (Smad6 et Smad7), contrôlent négativement la signalisation Smad en entrant en compétition avec les R-Smads pour leur récepteur ou au niveau de l'interaction avec les Co-Smads et dirigent les récepteurs vers une dégradation par le recrutement d'ubiquitine ligase (Kavsak *et al.*, 2000 ; Ebisawa *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001). Les Smads inhibiteurs peuvent aussi recruter et stabiliser le complexe de protéines phosphatases PP1/GADD34 au niveau du récepteur TGF- β activé, induire la déphosphorylation du récepteur et sa désactivation (Shi *et al.*, 2004). Le sentier Smad n'est pas l'unique voie servant au TGF- β pour réguler des fonctions cellulaires puisque d'autres voies de signalisation incluant les MAP kinases, la voie NF- κ B ou la PI3 kinase/AKT sont induites (Massague et Chen, 2000 ; Lutz et Knaus, 2002 ; Derynck et Zhang, 2003).




Dans la carcinogenèse colorectale, des mutations inactivant la signalisation du TGF- β ont été identifiées dans la transition adénome à carcinome (Fearon et Vogelstein, 1990). Parmi les mutations les plus nombreuses, on retrouve celle du récepteur au TGF- β de type II (TGFB2) (Markowitz *et al.*, 1995 ; Grady *et al.*, 1999). Des mutations dans Smad2 et Smad4 se produisent fréquemment dans les cancers colorectaux (Eppert *et al.*, 1996 ; Takagi *et al.*, 1996). Ces observations démontrent que la perte de la signalisation du TGF- β au niveau de l'intestin confère un avantage prolifératif aux cellules. Un autre exemple de l'importance des membres de la superfamille du TGF- β a été démontré par He *et al.*, qui ont généré un modèle murin n'exprimant plus le récepteur BMPRII dans l'épithélium intestinal. Ils ont démontré que la perte de la signalisation de ce récepteur entraîne une hyperprolifération cryptale, attribuable à l'inactivation de PTEN et à l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Ainsi, He *et al.* ont suggéré que les BMPs contrecarrent la signalisation WNT dans la crypte, assurant ainsi un contrôle du renouvellement des cellules souches.

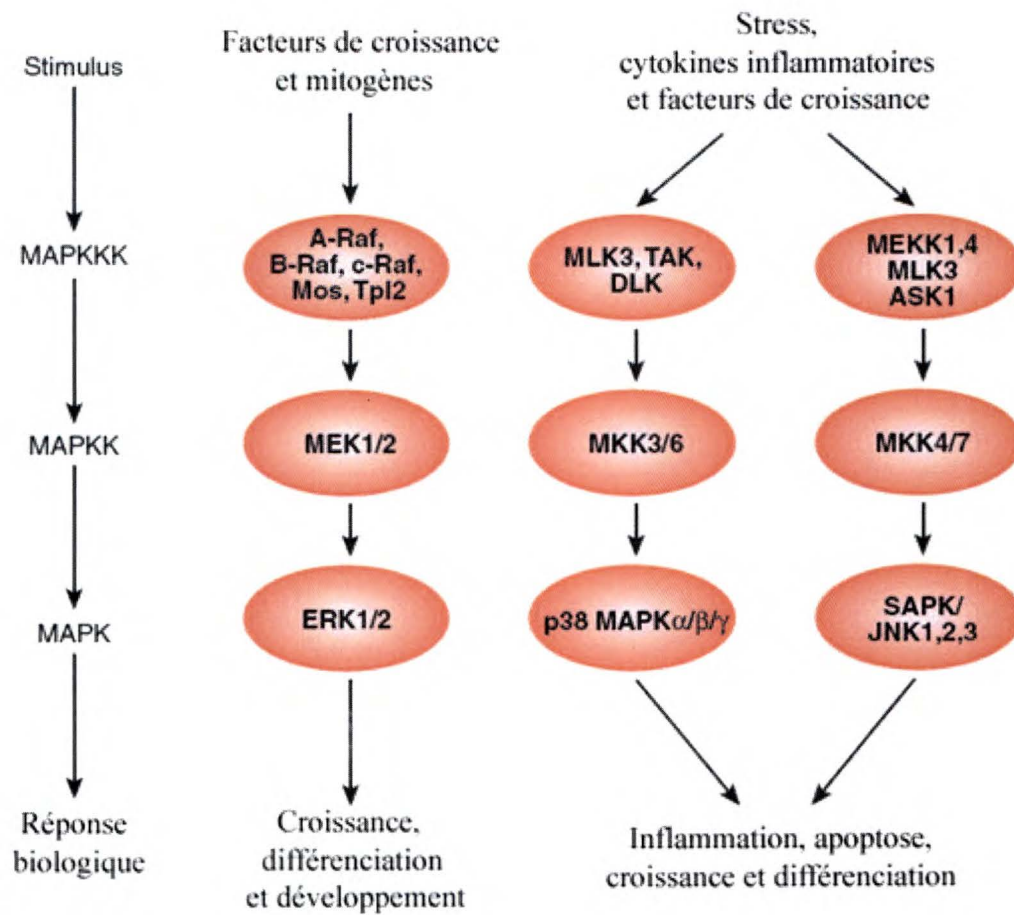
8. Les MAP kinases retrouvées au niveau de l'intestin

Les cellules réagissent aux stimuli extracellulaires entre autre en activant des mécanismes de signalisation par phosphorylation et déphosphorylation de molécules intracellulaires (Fig. 5). Il en résulte des modifications rapides et réversibles, permettant à la cellule de répondre de façon rapide et spécifique à un stimulus extracellulaire. Les MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) sont composées de trois familles principales : les ERKs (extracellular signal regulated proteins

**Figure 5 Séquence d'activation des cascades de la signalisation
des MAP kinases**

Tiré et modifié du site www.cellsignal.com.

-  ⇒ Kinase
-  ⇒ Phosphatase
-  ⇒ Facteur de transcription



kinases) aussi connues comme p42/p44 ou ERK2 et ERK1 respectivement, les JNKs (c-Jun N-terminal kinases) ou SAP kinases (stress-activated proteins kinases) qui sont composées des protéines p46, p54 et JNK3, et les MAP kinases p38 (α , β , δ et γ). Les MAP kinases sont activées par phosphorylation d'un motif TXY par des activateurs spécifiques, les MAPK kinases. L'inactivation des MAP kinases survient par déphosphorylation de résidus spécifiques effectuée par plusieurs tyrosines phosphatases et MAP kinases phosphatases à double spécificité (MKP). Les MAP kinases catalysent la phosphorylation de leurs cibles comprenant, entre autres, des facteurs de transcription et des protéines kinases telles, les MAPKAP kinases. Le mécanisme d'activation dépend de l'interaction de la MAP kinase à la protéine cible via un domaine de liaison reconnu par la MAP kinase (docking site), qui varie d'une MAP kinase à l'autre, suivi de la phosphorylation d'une sérine ou d'une thréonine positionnée en amont d'une proline (motif minimal de phosphorylation).

9. Les MAP kinases ERK1/2

Les MAP kinases ERK1 et ERK2 sont exprimées de façon ubiquitaire (Ahn et al., 1990 ; Marshall, 1995 ; Seger et Krebs, 1995), et requièrent une double phosphorylation sur un motif TXY pour leur activation (Ahn et al., 1990). Cette phosphorylation est apportée par l'activateur MAPK kinase (MEK) qui lui-même est activé par l'oncoprotéine Raf (une MAPKK kinase) (Ahn et al., 1990 ; Blenis, 1993) (Fig. 6). La protéine Raf est activée par Ras (Vojtek et Cooper, 1995 ; Marais *et al.*, 1997). L'activation de Ras se fait via la protéine SOS (facteur d'échange) qui lie

Figure 6 La cascade des MAP kinases p42/p44

Tiré et modifié du site www.cellsignal.com.



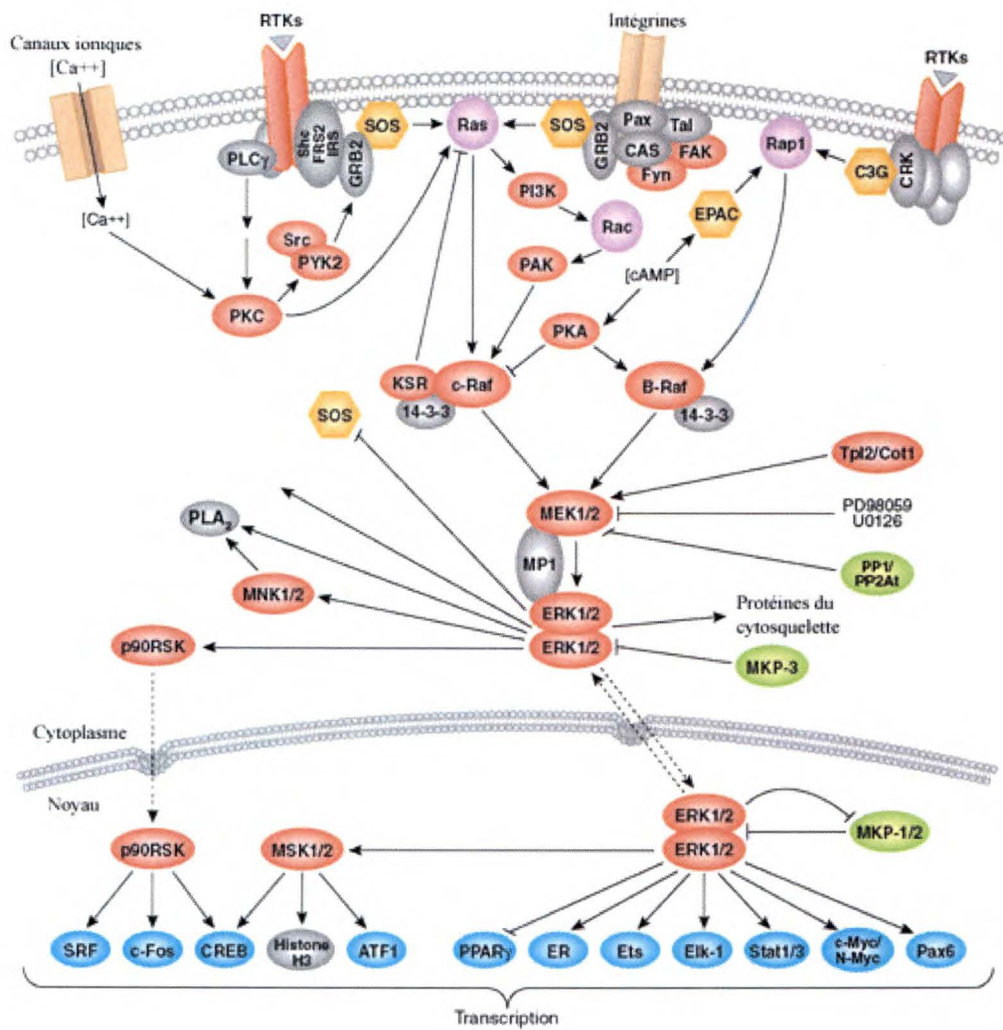
⇒ Kinase



⇒ Phosphatase



⇒ Facteur de transcription



l'adaptateur Grb2, permettant la liaison à un récepteur tyrosine kinase (Egan *et al.*, 1993). Lorsqu'activées, ERK1 et ERK2 transloquent au noyau où elles phosphorylent et activent plusieurs facteurs de transcription comme Elk-1, ATF-2, c-Jun, CHOP et Sp1 (Pulverer *et al.*, 1991 ; Gilles *et al.*, 1992 ; Marais *et al.*, 1993 ; Nishida et Gotoh, 1993 ; Merchant *et al.*, 1999). Les MAP kinases ERKs jouent un rôle central dans la régulation de la prolifération cellulaire, particulièrement dans le contrôle du point de restriction en phase G1 (Meloche *et al.*, 1992 ; Brunet *et al.*, 1994 ; Cowley *et al.*, 1994). En effet, l'inhibition de l'activité ERK1/2 bloque la progression dans le cycle cellulaire (Pages *et al.*, 1993 ; Brondello *et al.*, 1995). Au niveau des cellules épithéliales intestinales, l'inhibition de l'activité ERK1/2 dans les cellules IEC-6 produit un arrêt en G1 et réprime fortement la transcription dépendante des E2Fs dans les cellules adénocarcinomeuses Caco-2/15 (Aliaga *et al.*, 1999). Les formes phosphorylées actives des ERKs sont localisées au noyau des cellules de la crypte intestinale. Une activation élevée des ERK1/2 stimule la prolifération alors qu'un faible niveau d'activité soutenu corrèle avec un arrêt en G1 et la différenciation entérocytaire (Aliaga *et al.*, 1999 ; Boucher et Rivard, 2003).

Dans les cellules prolifératives au niveau de la crypte, tous les composants de la cascade de transduction de signal (Ras, Raf, MEK, ERK) sont activés par des signaux mitogéniques. Il a été démontré que l'activation constitutive de Ras induit la transformation des cellules épithéliales intestinales (Yoakum *et al.*, 1985 ; Rhim, 1989 ; Boucher *et al.*, 2004). D'ailleurs, K-Ras est l'oncogène le plus fréquemment retrouvé dans les cancers colorectaux. Finalement, la surexpression d'un mutant




MEK1 constitutivement actif dans les cellules intestinales épithéliales induit également la transformation cellulaire caractérisée par une prolifération en absence de facteurs de croissance et d'ancrage et à post-confluence (Boucher *et al.*, 2004).

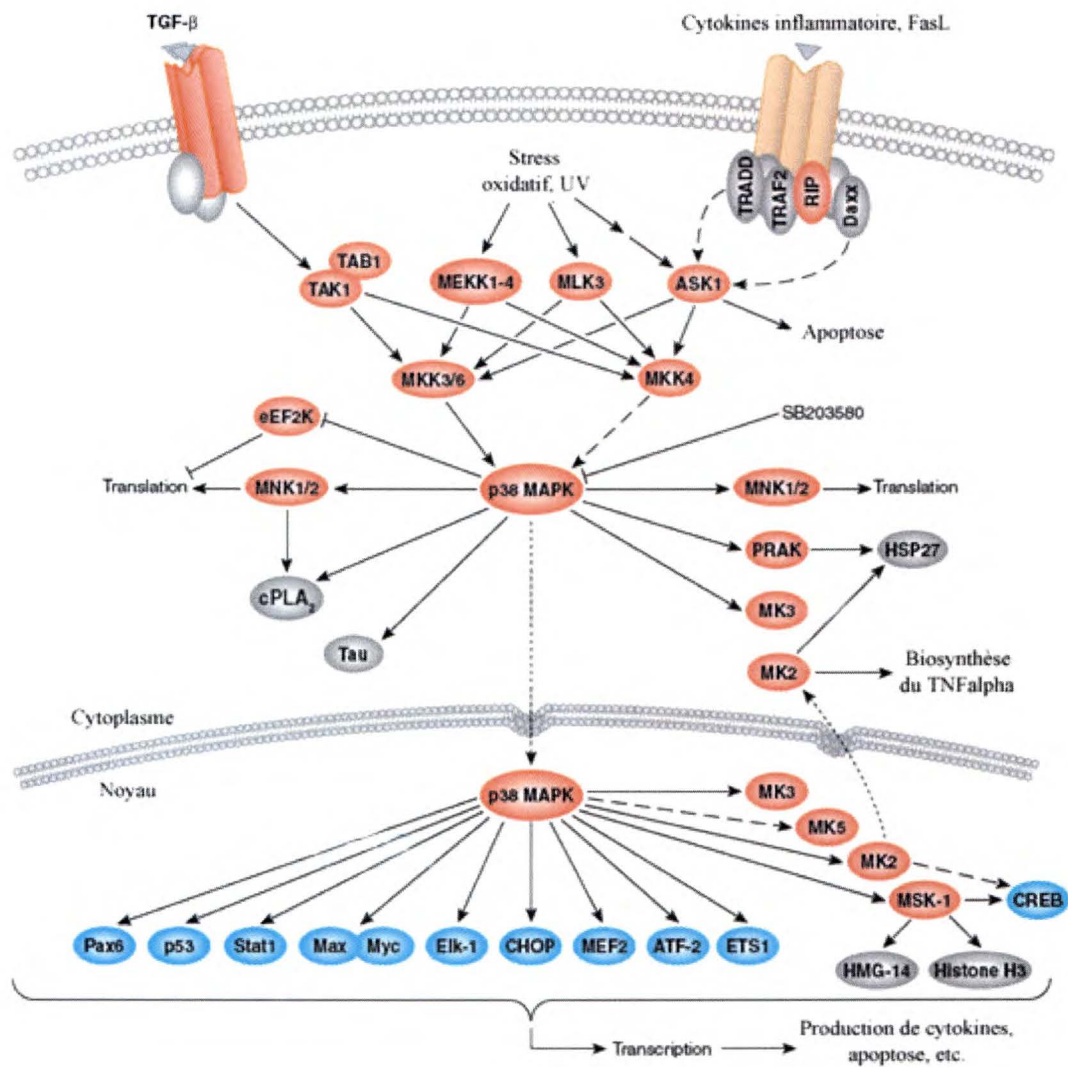
10. Les MAP kinases p38

Les MAP kinases p38 comptent quatre isoformes partageant 60% d'homologie entre elles (Ono et Han, 2000). Alors que deux isoformes sont exprimés de façon ubiquitaire (p38 α , p38 β), p38 γ est exprimé surtout dans le muscle squelettique et p38 δ principalement au niveau des poumons, des reins, des testicules, du pancréas et de l'intestin grêle. Parmi les stimuli extracellulaires de la cascade des MAP kinases p38, on retrouve une grande variété de cytokines (IL-1, IL-2, IL-7, IL-17, IL-18, TGF- β et TNF- α) ainsi qu'un grand nombre de produits bactériens pouvant activer p38 via différents récepteurs Toll. Parmi ceux-ci, on retrouve le lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycan, l'entérotoxine B, l'échovirus et l'herpes simplex virus 1 (Ono et Han, 2000). De plus, plusieurs facteurs de croissance (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, *colony stimulating factor 1*, érythropoïétine) et des changements dans l'environnement tel que l'osmolarité, les ultraviolets, les radicaux libres et l'hypoxie peuvent aussi induire l'activité p38 (Ono et Han, 2000). Parmi les MAPK kinases responsables de l'activation des p38, on retrouve MKK3, MKK4 et MKK6, MKK3 activant principalement p38 α , p38 γ et p38 δ . Plusieurs MAPKK kinases activant la cascade ont été identifiées, ce qui explique pourquoi la cascade peut être activée par une grande variété de stimuli (Fig. 7). Les différentes MAP kinases p38 sont phosphorylées par MKK3 et MKK6, elles-mêmes substrats de

Figure 7 La cascade des MAP kinases p38

Tiré et modifié du site www.cellsignal.com.

-  ⇒ Kinase
-  ⇒ Phosphatase
-  ⇒ Facteur de transcription



plusieurs MAPKK kinases incluant l'« *apoptosis signal-regulated kinase-1* » (ASK1) et « *TGF- β -activated kinase-1* » (TAK1) (Ip et Davis, 1998 ; Davis, 2000). L'activité p38 est réduite par des phosphatases spécifiques capables de déphosphoryler non seulement les MAP kinases p38, mais aussi les ERKs et JNKs (Sun *et al.*, 1993). Les cibles de p38 sont soit d'autres kinases ou des facteurs de transcription comme ATF-2, capables de s'hétérodimériser avec le facteur de transcription c-jun du complexe AP-1. L'activité de la MAP kinase p38 peut aussi être associée à une activation de NF- κ B, puisque l'inhibiteur de p38, le SB203580, inhibe la transcription dépendante de NF- κ B (Bergmann *et al.*, 1998 ; Nick *et al.*, 1999). La MAPKAP kinase 2 (MK2) est une des kinases directement phosphorylées par la MAP kinase p38. Les souris déficientes en MK2 présentent une résistance et une survie accrues lors de l'induction d'un stress endotoxique causé par le LPS, avec une induction d'environ 90% des niveaux de TNF- α (Kotlyarov *et al.*, 1999). La MAP kinase p38 active la cyclooxygénase-2 (COX-2) suite à une stimulation à l'angiotensine II (Slice *et al.*, 2005). Dans l'intestin, l'isoforme p38 α est impliquée entre autre dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Houde *et al.*, 2001 ; Eferl et Wagner, 2003). Au niveau de l'axe crypte-villosité de l'intestin fœtal humain, les formes activées phosphorylées des p38 sont retrouvées dans le noyau des cellules différenciées ou elle contrôle l'expression de la sucrase-isomaltase via la phosphorylation et l'activation transcriptionnelle de Cdx2 (Houde *et al.*, 2001).

11. Facteurs de transcription Cdx

Cette famille de facteurs de transcription fait partie des gènes à homéobox, caractérisés par la présence d'un homéodomaine. L'homéodomaine permet une interaction avec l'ADN ou une interaction entre les protéines. Cette famille de gènes homéobox a été découverte en 1984. Le premier identifié a été le gène *Caudal* chez la drosophile, suivi des gènes Cdx1 (Duprey *et al.*, 1988), Cdx2 (James *et al.*, 1994) et l'homologue de Cdx2 chez le hamster appelé Cdx3 (German *et al.*, 1992). Les protéines produites par ces différents gènes compte respectivement 265 acides aminés pour Cdx1, 310 pour Cdx2, 313 pour Cdx3 et 284 pour Cdx4.

Le gène homéobox *Caudal* chez la Drosophile est nécessaire autant pour la formation du segment postérieur que du développement tardif et du maintien de l'intestin (Gamer et Wright, 1993). Des homologues du gène *Caudal* ont été identifiés dans une multitude d'organismes de *C. elegans* à l'homme (Burglin *et al.*, 1989 ; Joly *et al.*, 1992 ; Gamer et Wright, 1993 ; Beck *et al.*, 1995 ; Drummond *et al.*, 1997 ; Levy *et al.*, 2002), et jouent un rôle critique dans le développement et le maintien de l'épithélium intestinal (Silberg *et al.*, 2000 ; Beck, 2002, Lengyel et Iwaki, 2002), et dans la carcinogenèse autant au niveau du côlon que d'autres tissus (Ee *et al.*, 1995 ; Mallo *et al.*, 1997 ; Silberg *et al.*, 1997 ; Hinoi *et al.*, 2001 ; Bai *et al.*, 2002 ; Satoh *et al.*, 2002 ; Eda *et al.*, 2003 ; Phillips *et al.*, 2003).

Chez la souris et l'humain, on retrouve trois homologues du gène *Caudal*: Cdx1, Cdx2 et Cdx4. Exprimés tôt dans l'embryogenèse, les Cdx jouent un rôle important dans la

définition des structures postérieures. Cdx1 et Cdx2 sont impliqués dans le développement de l'épithélium intestinal (Guo *et al.*, 2004). Parmi les mécanismes contrôlant l'activité de Cdx2, on retrouve la phosphorylation par la MAP kinase p38 (Houde *et al.*, 2001). Les Cdx sont constitués d'un domaine N-terminal comportant trois régions bien conservées (Gamer et Wright, 1993). Le domaine A de Cdx2 possède une séquence servant de signal d'exportation cytoplasmique (Trinh *et al.*, 1999) et près du domaine B, on retrouve un site de phosphorylation, la sérine 60, qui est phosphorylée par les MAP kinases ERK1/2 (Rings *et al.*, 2001). Cette phosphorylation permet de réprimer l'activité transcriptionnelle de Cdx2 au niveau de la crypte intestinale. Un domaine important pour le contrôle de la stabilité de la protéine Cdx2, constitué d'une séquence d'acides aminés RXL, est aussi présent dans la portion N-terminale (Boulanger *et al.*, 2005). Le domaine C-terminal contient le domaine de liaison à l'ADN, l'homéodomaine et une séquence de 4 sérines dont la phosphorylation contrôlerait la dégradation de Cdx2 par le protéasome (Gross *et al.*, 2005).

12. Rôle des protéines Cdx durant le développement intestinal

Cdx1 est d'abord exprimé chez la souris au jour 7.5 post-coïtum au niveau de l'endoderme et du mésoderme de la strie primitive. L'expression se maintient dans les structures secondaires comme le tube neural, les somites, le méso-néphros et les bourgeonnements donnant naissance aux membres (Duprey *et al.*, 1988 ; Silberg *et al.*, 2000 ; Prinos *et al.*, 2001). Cdx2 est exprimé au jour 3.5 post-coïtum et plus tardivement dans la partie postérieure de l'intestin et du tube neural ainsi qu'au niveau

du bourgeon de queue. Au jour 12.5 post-coïtum, l'expression de Cdx2 est restreinte exclusivement à l'endoderme de l'intestin primitif, et est maintenue par la suite (James *et al.*, 1994 ; Beck *et al.*, 1995 ; Silberg *et al.*, 2000).

L'inactivation de Cdx1 chez la souris entraîne une inversion homéotique antérieure de l'axe du squelette, sans un phénotype intestinal (Subramanian *et al.*, 1995 ; Beck, 2002 ; Lohnes, 2003). Alors que l'invalidation de Cdx2 est létale, des souris Cdx2^{+/-} hétérozygotes montrent une inversion homéotique antérieure autant au niveau de l'axe du squelette qu'au niveau de la muqueuse intestinale. De plus, les animaux hétérozygotes développent des lésions ressemblant à des polypes, plus fréquemment au niveau du caecum. Ces polypes, qui ne sont pas néoplasiques et ne se transforment pas en adénocarcinome, sont caractérisés par l'absence complète de Cdx2. Toutes ces observations ont permis de considérer Cdx2 comme un gène suppresseur de tumeurs (Chawengsaksophak *et al.*, 1997 ; Beck *et al.*, 1999 ; Tamai *et al.*, 1999 ; Beck, 2002).

Cdx1 et Cdx2 sont exprimés le long de l'axe proximo-distal (James *et al.*, 1994 ; Beck *et al.*, 1995 ; Silberg *et al.*, 1997 ; Silberg *et al.*, 2000). En effet, l'expression de Cdx2 augmente progressivement à partir du duodénum jusqu'à la partie terminale de l'intestin grêle et au niveau du côlon proximal. L'expression de Cdx1 augmente graduellement le long de l'intestin grêle avec un maximum au niveau du côlon distal. Au niveau de l'axe crypte-villosité, Cdx1 est exprimé plus fortement au niveau de la crypte, avec une faible expression dans les entérocytes de la villosité (Silberg *et al.*, 1997 ; Silberg *et al.*, 2000) et les colonocytes de surface. Au contraire de Cdx1, Cdx2

est exprimé plus fortement dans les villosités que dans les cryptes (James *et al.*, 1994 ; Boulanger *et al.*, 2005).

13. Cibles des facteurs de transcription Cdx

Cdx1 et Cdx2 sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la différenciation des entérocytes. La première cible de Cdx2 identifiée et encore la mieux documentée est la sucrase-isomaltase (Traber *et al.*, 1992 ; Suh et Trabert, 1996 ; Tung *et al.*, 1997). La séquence de reconnaissance est riche en bases A et T, soit : TTTAT (A/G) ou TTTA (T/C) (Suh et Trabert, 1996 ; Di Guglielmo *et al.*, 2001 ; Uesaka *et al.*, 2004). Cdx1 et Cdx2 lient les mêmes séquences d'ADN et peuvent induire plusieurs gènes communs. Mais dans certains cas, Cdx1 et Cdx2 induisent des cibles différentes (Bai *et al.*, 2003 ; Mesquita *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2003). Parmi les gènes cibles des Cdx exprimés au niveau de l'intestin grêle et du côlon, on retrouve la MUC2, le KLF4, la clusterin, l'antigène A33, les NHE2 et NHE3, la guanyl cyclase C (GC-C) et la LI-cadhérine (Dang *et al.*, 2001 ; Malakooti *et al.*, 2001 ; Suh *et al.*, 2001 ; Hinoi *et al.*, 2002 ; Johnstone *et al.*, 2002 ; Malakooti *et al.*, 2002 ; Mesquita *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2003). L'expression de certains gènes est limitée à l'intestin grêle, comme la sucrase-isomaltase, la lactase (LPH), l'intestinal phospholipase A/lyso-phospholipase (IPAL), la calbindin-D9K et le récepteur de la vitamine D (Suh *et al.*, 1994 ; Hecht *et al.*, 1997 ; Taylor *et al.*, 1997a ; Troelsen *et al.*, 1997 ; Colnot *et al.*, 1998 ; Yamamoto *et al.*, 1999 ; Patterson *et al.*, 2003). L'anhydrase carbonique 1 est une cible de Cdx uniquement exprimée dans le côlon (Drummond *et al.*, 1998). L'équipe de Trabert a surexprimé Cdx2 dans

les cellules IEC-6 et a observé premièrement, un arrêt de prolifération de plusieurs jours, suivi d'une période de croissance et de l'établissement d'une culture plus dense et plus stable que celles obtenues avec les cellules n'exprimant pas Cdx2. Ils ont aussi observé la formation de structures multicellulaires caractérisées d'un épithélium cylindrique avec une morphologie ressemblant à celle de l'épithélium intestinal (Suh et Traber, 1996). Cependant, le mécanisme d'action de Cdx2 dans l'induction du processus de différenciation entérocytaire reste à être élucidé.

14. Objectifs du projet de recherche

Cdx2 est un facteur impliqué dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Suh et Traber, 1996), et est impliqué dans l'expression de plusieurs enzymes de la bordure en brosse. Il a été montré précédemment que la MAP kinase p38, active dans le noyau des cellules différenciées de la villosité, lie et phosphoryle le facteur de transcription Cdx2, ce qui est nécessaire à son activité transcriptionnelle sur une de ses cibles, le promoteur de la sucrase-isomaltase (Houde *et al.*, 2001). Le premier objectif de mon projet de recherche était d'identifier le site de liaison de la MAP kinase p38 α sur Cdx2 et de déterminer le ou les sites de phosphorylation sur Cdx2 de la MAP kinase p38 α . Le deuxième objectif consistait à créer une lignée IEC-6 surexprimant de manière stable l'homologue de Cdx2 étant en notre disposition, Cdx3, et d'identifier de nouvelles cibles génétiques afin de mieux comprendre le rôle de Cdx2 dans le contrôle de la différenciation entérocytaire.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules Caco-2/15 provenant d'un adénocarcinome de côlon humain (J.-F. Beaulieu, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke, QC, Canada) ainsi que les cellules embryonnaires humaines de rein transformées HEK293T (A. Nepveu, Department of Oncology, McGill University, Montréal, QC, Canada) ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplémenté de 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) et 2 mM de GlutaMAX (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Les cellules de cryptes intestinales de rat IEC-6 (A. Quaroni, Cornell University, Ithaca, NY, USA) ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 5% de FBS et de 2 mM de GlutaMAX. Les différentes lignées ont été cultivées à une température de 37°C dans une atmosphère contenant 95% d'air et 5% de CO₂.

2. Plasmides et constructions

Le vecteur d'expression pour la protéine de hamster CDX3 (pBATCDX3) nous a été fourni par German *et al.* (German *et al.*, 1992). Le vecteur luciférase SILuc contenant la portion -183 à +54 du promoteur de la sucrase-isomaltase nous fut gracieusement donné par Dr P.G. Traber, tel que décrit par Houde *et al.* (2001). Le vecteur luciférase CE-LPHLuc contenant la portion -227 à -17 du promoteur de la lactase phlorizine

hydrolase nous fut gracieusement donné par Dr Jesper T. Troelsen (Mitchelmore *et al.*, 2000). Le vecteur luciférase pGL2-SAA2pt contenant la portion -1196 à +22 du promoteur du sérum amyloïde A2 nous fut gracieusement donné par Dr A.S. Whitehead (Uhlir *et al.*, 1997).

3. Mutagenèse dirigée

Les constructions S33A, S60A, S99A et S108A ont été réalisées par la méthode de mutagenèse dirigée « Overlap Extension » (Fig. 8), avec la technique de PCR (polymerase chain reaction) par remplacement de la portion entre les sites de restriction *AvrII* et *EcoRI* du vecteur d'expression pBATCDX3 (Fig. 9) (German *et al.*, 1992). Toutes les amorces ont été synthétisées chez Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada), les amorces externes étant respectivement en 5' CDX3-AVRII - 5' CTA **GCC TAG GAC** ACC ATG TAC GTG 3' – et en position 3' MUTF-DOWN – 5' CCG **GAA TTC** TCT GCC GCC GCT 3' ou les bases en caractère gras représentent les sites de restriction ajoutés. Les amorces internes pour les différents mutants étaient les suivantes ; S33A sens, S33A-S – 5' CCG CAG AAC TTT GTG **GCG** CCC CCG CAG TAC CCG 3' et anti-sens S33A-AS – 5' CGG GTA CTG CGG GGG **CGC GAC** AAA GTT CTG CGG 3' ; pour S60A sens, MUTB-A – 5' GAC AGC GCT CAG **GCG** CCA GGG CCA 3' et anti-sens MUTB-AS – 5' TGG CCC TGG **CGC** CTG AGC GCT GTC 3' ; pour S99A sens, MUTC-NAR-S – 5' CTC AAC GGG GGC **GCC** CCG GCC GCC 3' et anti-sens MUTC-NAR-AS – 5' GGC GGC CGG **GGC** GCC CCC GTT GAG 3' ; pour S108A sens, MUTD-S – 5' ATG GGC TAC AGC **GCC** CCC GCC GAC 3' et anti-sens, MUTD-AS – 5' GTC

**Figure 8 Technique de PCR par la méthode « Overlap
Extension »**

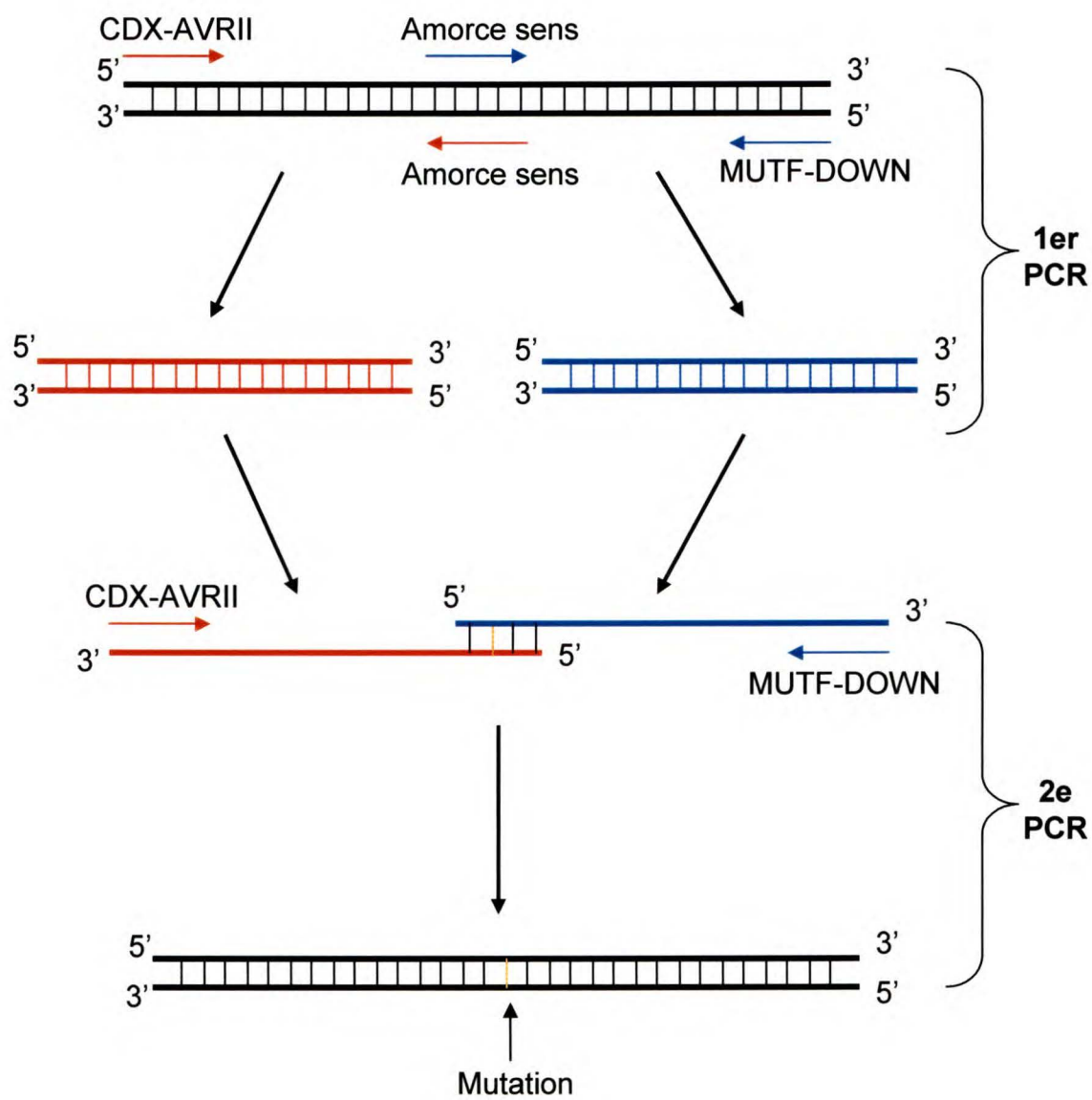
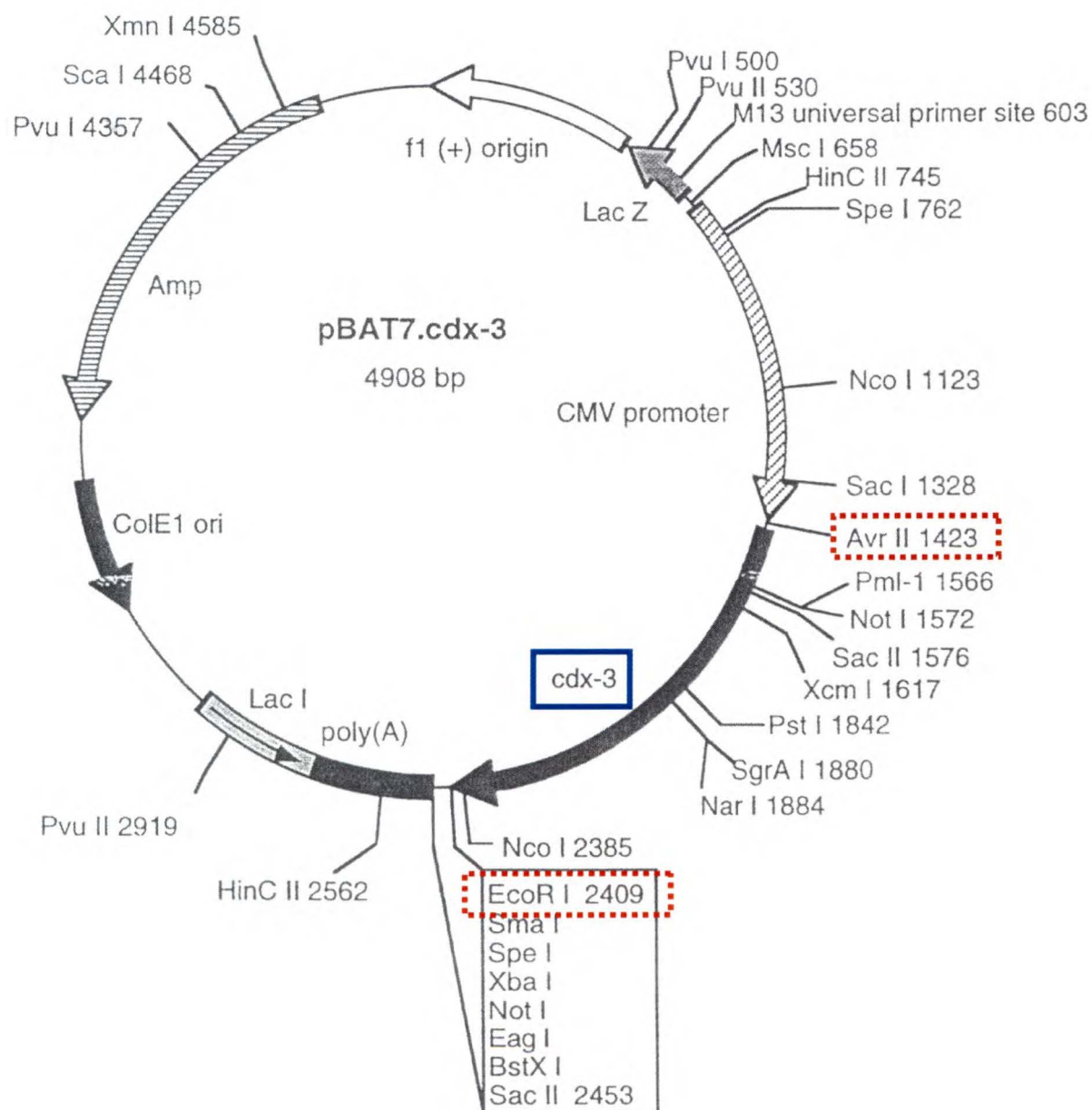


Figure 9 Vecteur d'expression de Cdx3 (German *et al.*, 1992)

Les différents mutants de Cdx3 ont été introduits dans les sites *Avr*II et *Eco*RI du vecteur pBATCDX3 (German *et al.*, 1992).



GGC GGG GGC GCT GTA GCC CAT 3' (Fig. 10) ou les bases en caractère gras représentent les sites où des mutations ont été réalisées. La réaction PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : 100 ng de l'ADN de départ (pBATCDX3) 10 mM de chaque nucléotide (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 30 pmoles de chaque oligonucléotide, 4 µL de DMSO, 10 µL de tampon 10X pour l'ADN polymérase *PfuI* et 2 unités de l'ADN polymérase *PfuI* (Stratagene, La Jolla, CA, USA). La solution a été complétée à 100 µL avec de l'eau stérile. L'appareil PCR utilisé est un Personal ThermoCycler (Biometra, Montréal Biotech, Montréal, QC, Canada) en utilisant le programme Overlap Extension qui comprend les conditions suivantes (Tableau 1), mais précédé d'un démarrage de type Hot Start avec les tubes placés dans l'appareil seulement lorsque la température est de 94°C .

Tableau 1 : Programme de PCR « overlap extension »

Nombre	Dénaturation	Hybridation	Polymérisation
Premier cycle	2 minutes 94°C	-	-
20 cycles	1 minute 94°C	1 minute 50°C	1 minute 72°C
Dernier cycle	1 minute 94°C	-	10 minutes 72°C

Après la réaction de PCR, les fragments ont été séparés sur un gel d'agarose 1% (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). La bande correspondante a été coupée et placée dans un tube Eppendorf stérile contenant environ 1 cm de laine de verre compactée dans lequel deux trous ont été perforés. Ce tube a été placé sur un autre tube Eppendorf et centrifugé cinq minutes à 13000 RPM. Le fragment récupéré a été

**Figure 10 Liste des mutations site-spécifiques réalisées sur la
séquence complète de Cdx3**

AH = Alpha helix (hélice alpha)

RC et R = Random Coil (structure surenroulé)

ES = Extended Strand (structure en zig zag)

1 MYVSYLLDKDVSMYP**SS**VRH**SGGLN**LAPQNFV**S**PPQYPDYGGYHVAAAAA 50
 |----- Random Coil -----||
 51 AAANLDSAQ**S**PGPSWSTAYGAPLREDWNGYPPGGAAAAANAVAHGLNGG**S**P 100
 AH-----||----- Random Coil -----||----- AH-----||-----
 101 AAAMGY**S**PADYHAHHHPHHHPHHHPAAAPSCA**S**GLLQTLNPGPPGPAATG 150
 |----- Random Coil -----
 151 AA**EQLS**PSGQRRNLCEWMRKPAQPSL**S**QVKTRTKDKYRVVYTDHQRL**EL** 200
 |-----||----- AH-----||----- Random Coil -----||----- ES-----||----- AH-----
 201 EKEFHYSRYITIRRKAE**LAATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKINKKKLQO** 250
 |-----||----- RC-----||----- AH-----||----- RC-----||----- AH-----
 251 QQQQQQQQQLA**S**PPPQPSQPQPGSLRSVPEPL**S**PVSSLQGSVPGSVPGVL 300
 |-----||----- Random Coil -----
 301 GPAGGV**LNPTVTQ** 313

purifié par une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamyl (25 : 24 : 1) dans un ratio de 1/1, après centrifugation à 13000 RPM pendant 15 minutes. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf. L'ADN a été précipité par l'ajout d'acétate de sodium 3M 1 :10 et d'éthanol 100% froid, et centrifugé pendant 30 minutes à 13000 RPM. Le culot a été ensuite resuspendu dans un volume de 30 µL et utilisé pour la seconde réaction PCR.

La seconde réaction PCR a été réalisée en utilisant 50 ng de chacun des fragments obtenus lors de la première réaction et en utilisant les amorces externes CDX3-AVR11 et MUTF-DOWN. Les fragments obtenus ont été digérés par les enzymes *AvrII* et *EcoRI*.

Les réactions PCR ont été purifiées sur colonne Microcon-PCR (Millipore, Bedford, MA, USA) pour enlever les amorces et les enzymes de restriction. Les fragments obtenus ont été ligaturés dans le vecteur pBATCDX3 préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction, à l'aide du Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) pendant 20 minutes à température de la pièce. Les produits ont été transformés dans les bactéries compétentes TOP 10F' *Escherichia coli* (Clontech, Mississauga, ON, Canada). La présence des mutations a été vérifiée par digestion à l'aide d'enzymes de restriction et par séquençage (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Calgary, AB, Canada).

Pour la construction S156A, un seul PCR a été réalisé pour remplacer la portion *NarI* et *EcoRI* du vecteur pBATCDX3 en utilisant les mêmes conditions de PCR utilisées précédemment. L'amorce sens a été MUTF-UP – 5' GCC ACC **GGC GGC** GCC GAA CAG CTG **GCT** CCC AGC GGC 3' et anti-sens MUTF-DOWN – 5' CCG **GAA TTC** TCT GCC GCC GCT 3'. Les séries de 6 bases en caractère gras représentent les sites de restriction et la base seule en caractère gras dans MUTF-DOWN représente la mutation insérée. La procédure de remplacement a été la même que mentionnée précédemment mais en utilisant les sites *NarI* et *EcoRI*.

4. Surexpression des différentes constructions

La transfection des différentes constructions de Cdx3 a été pratiquée dans la lignée cellulaire HEK 293T (boîte de culture de 20 cm²) pour 24 heures avant de faire des extractions de protéines nucléaires (Stein *et al.*, 1989), ou dans la lignée cellulaire Caco-2/15 (plaque de 24 puits) pour 48 heures avant d'y réaliser les essais luciférase. Les cellules au jour -1 de confluence d'une boîte de culture de 60 cm² ont été trypsinisées (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) et divisées (pour la lignée HEK 293T, un pétri de 60 cm² permet de faire 16 boîtes de culture de 20 cm²; pour la lignée Caco-2/15, une boîte de culture de 60 cm² permet de faire 40 puits de plaques de 24 puits). Le jour suivant, les cellules ont été transfectées par lipofection. La LIPOfectamine 2000 (1 µL de LIPOfectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) par 50 µL d'Opti-MEM) a été incubée dans le milieu Opti-MEM (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) à température de la pièce pour 5 minutes (Mélange A). Le mélange contenant l'ADN a été préparé en

utilisant 0.1 µg d'ADN des différentes constructions dans 50 µL d'Opti-MEM (total de 1 µg pour les transfections dans des pétris de 20 cm²). Pour les transfections transitoires dans les plaques de 24 puits, le gène rapporteur SILuc contenant une portion du promoteur du gène de la sucrase-isomaltase soit -183 à +54 cloné dans le vecteur pGL3 (Promega, Madison, WI, USA) en amont du gène de la luciférase a été ajouté à la solution d'ADN dans les mêmes proportions que les constructions Cdx3. Comme contrôle interne de transfection, le vecteur pRL-SV40 renilla (Promega, Madison, WI, USA) a été utilisé à une concentration de 1 ng par puit. Le mélange contenant l'ADN a été ajouté à un volume équivalent de mélange A, agité et incubé à température de la pièce pendant 20 minutes. Le mélange contenant la LIPOfectamine 2000 et l'ADN a été ajouté directement au milieu. Sept heures après la transfection, le milieu a été changé et les cellules ont été lysées après 24 heures (20 cm²) ou 48 heures (24 puits).

5. Essais luciférases

Brièvement, les essais luciférases ont été réalisés tels que décrit précédemment (Houde *et al.*, 2001). 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées dans 300 µL de tampon de lyse (25 mM gly-gly, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1% Triton X-100 et 1 mM DTT) pendant 30 minutes sous agitation à température de la pièce. À la lyse cellulaire, on a ajouté 100 µL de tampon d'essais (25 mM gly-gly, 4 mM EGTA, 15 mM KH₂PO₄, 6 mM ATP et 1 mM DTT) et 100 µL d'une solution de luciférine 1 mM (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada). L'activité luciférase a été mesurée durant 20 secondes à l'aide d'un luminomètre

Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Gaithersburg, MD, États-Unis). Comme contrôle interne d'efficacité de transfection, le vecteur luciférase pRL-SV40 renilla (Promega, Madison, WI, États-Unis) a été utilisé. Les résultats présentés ont été confirmés par des expériences répétées au moins quatre fois en quadruplicata.

6. Extraction des protéines nucléaires

Les extraits nucléaires ont été préparés tel que décrit précédemment (Stein *et al.*, 1989) avec certaines modifications (Désilets *et al.*, 2000). Vingt-quatre heures après la transfection, les boîtes de culture de 20 cm² de cellules ont été lavées 2 fois avec 1 mL de PBS 1X. Par la suite, les cellules ont été grattées et récupérées dans un tube Eppendorf stérile avec 1 mL de PBS 1X. Les cellules ont été culottées par une centrifugation de 2 minutes à 3000 RPM. Le culot de cellules a été resuspendu dans 200 µL de tampon de lyse (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonate pH 7.9, 1 mM éthylènediamine disodium tetraacetate (EDTA), 60 mM KCl, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) et incubé sur glace pendant 5 minutes. La solution a été centrifugée pendant 10 secondes à 13000 RPM pour culotter les noyaux, qui ont ensuite été resuspendus dans 200 µL de tampon de resuspension des noyaux (0.25 M Tris-HCl pH 7.8, 0.06 M KCl, 1 mM DTT et 1.5 mM PMSF). Les noyaux ont été soumis à trois cycles de 2 minutes dans l'azote liquide pour une congélation rapide, ensuite à 37°C pendant 2 minutes et vortexés durant 5 secondes. Les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13000 RPM. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et congelés rapidement dans l'azote liquide.

7. Gel de rétention

Un oligonucléotide double brin contenant le site de liaison à l'ADN de Cdx2 du promoteur de la sucrase-isomaltase SIF1 (sucrase-isomaltase footprint 1) (5'- GGA GGG TGC AAT AAA ACT TTA TGA GTA G – 3') avec des GG supplémentaires de chaque côté a été utilisé (Gheorghiu *et al.*, 2001). Les extrémités libres ont été remplies par des dCTP radiomarqués au ^{32}P (NEN PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) en présence des trois autres nucléotides froids et du fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E. coli* (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Le fragment obtenu a été purifié sur colonne de séphadex Probe Quant G50 (Amersham BioSciences, Baie d' Urfé, QC, Canada).

Les gels de rétention ont été effectués tel que décrit précédemment (Gheorghiu *et al.*, 2001). Les échantillons d'extraits nucléaires ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante dans un volume total de 20 μL contenant 5 μg d'extrait nucléaire, 2 μL de tampon 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 50% glycérol), 0.25 μg de dIdC (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) et 1 μL de la sonde radioactive à une intensité d'environ 50 CPS (counts per second). Suivant une pré-migration de 30 minutes, les échantillons ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 4% contenant 0.5% de tampon Tris-Borate (TBE) (45 mM Tris-borate pH 8.0, 40 mM acide borique, 1 mM EDTA) et 2% glycérol (Tableau 2) pour approximativement 2 heures à 150 volts. Le gel a été ensuite séché sur papier Whatmann avec un sécheur de gel Savant 2000 et exposé

pour la nuit à -80°C dans une cassette pour autoradiographie avec un écran et un film Kodak BioMax MR (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada).

Tableau 2 Préparation du gel de polyacrylamide

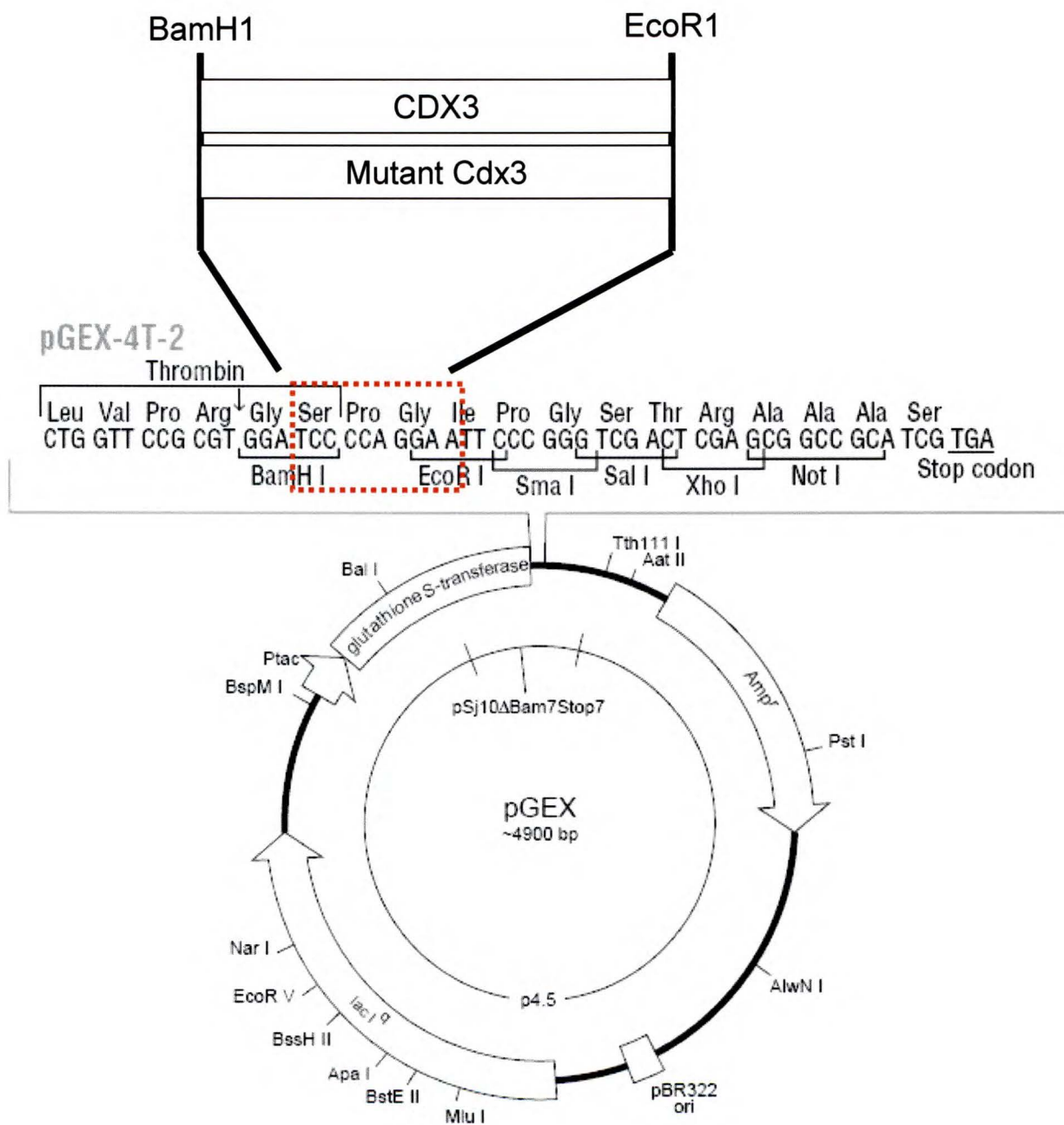
Produit	Quantité	Concentration finale
Mélange Acrylamide-Bis-acrylamide (30 :1)	8 mL	4%
Glycérol 50%	2 mL	2%
TBE 10X	2.25 mL	0,5X
Eau distillée	40.75 mL	-
Ammonium persulfate	0.01 g	2.2 mg/mL
TEMED	0.05 mL	-

8. Création des protéines de fusion GST

Les différents mutants de Cdx3 ont été clonés de façon à conserver le même cadre de lecture en aval de la glutathion S-transférase (GST) dans le vecteur pGEX 4T2 (Fig. 11) (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) inducible à l'IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranoside). Afin de cloner la séquence de Cdx3 de type sauvage, une réaction de PCR a été réalisée en utilisant les amorces suivantes pour remplacer le site de restriction *AvrII* par celui de *BamHI* (les bases en caractère gras représentent les sites de restriction insérés dans la séquence) : amorce sens BAMHI-

Figure 11 Vecteur de fusion pGEX 4T2

Les séquences encodant différentes mutations de Cdx3 ont été introduites dans le même cadre de lecture afin de produire les protéines de fusion GSTCDX3, entre les sites *Bam*HI et *Eco*RI.



CDX3-UP 5'- CCG CGT **GGA TCC** ACC ATG TAC GTG AGC TAC – 3' et amorce antisens MUTF-DOWN – 5' CCG **GAA TTC** TCT GCC GCC GCT 3'. Des constructions contenant seulement la portion N-terminale (1-180) ou C-terminale (180-313) ont aussi été réalisées en suivant la même méthode mais en utilisant les amorces : Cdx3 1-180 sens BAMH1-CDX3-UP 5'- CCG CGT **GGA TCC** ACC ATG TAC GTG AGC TAC – 3', Cdx3 1-180 antisens 180-DOWN-ECOR1 – 5' TCA CTA **GAA TTC** TTA TTG GCT TCC CAG GGA CGG 3', Cdx3 180-313 sens 180-UP-BAMH1 – 5' TCA CTA **GGA TCC** ATG CAA GTG AAA ACC AGG ACG 3' et Cdx3 180-313 antisens MUTF-DOWN – 5' CCG **GAA TTC** TCT GCC GCC GCT 3' (les bases en caractère gras représentent les sites de restriction insérés dans la séquence). Les fragments ont été ligaturés dans le vecteur pGEX 4T2 préalablement digéré avec les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI et isolés comme mentionné précédemment. Des mutants de délétion ont été construits en utilisant des enzymes de restrictions possédant un site unique, soit *Sgr*AI et *Sty*I (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) : le vecteur pGEX 4T2 contenant Cdx3 a été digéré par un de ces enzymes ainsi qu'avec l'enzyme *Eco*RI. Le vecteur a été isolé et les extrémités ont été remplies pour obtenir des bouts francs à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E. coli*. Les extrémités ont été ligaturées comme mentionné précédemment pour obtenir 2 mutants de Cdx3 soit : Cdx3 1-139 (*Sgr*AI) et Cdx3 1-234 (*Sty*I). Les délétions Δ 33-44, Δ 61-76, Δ 77-88, Δ 89-107, Δ 108-126 et Δ 127-142 ont été construites dans la portion N-terminale de Cdx3 (1-180) par la méthode de PCR « Overlap extension » en utilisant comme amorce externe sens BAMH1-CDX3-UP 5'- CCG CGT **GGA TCC** ACC ATG TAC GTG AGC TAC – 3' et anti-sens 180-

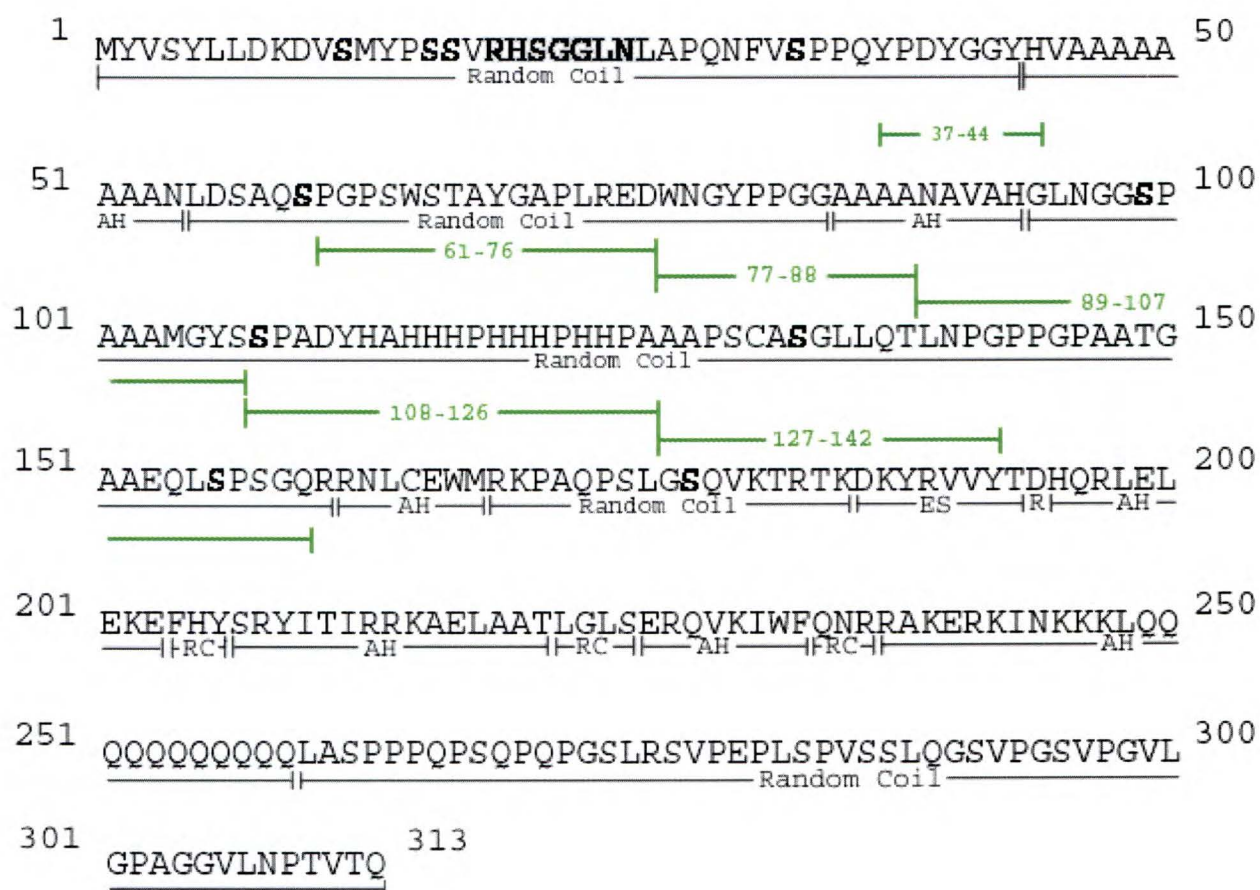
DOWN-ECOR1 – 5' TCA CTA **GAA TTC** TTA TTG GCT TCC CAG GGA CGG 3'. Les amorces internes pour les différentes constructions étaient : pour Δ33-44, sens Δ33-44-S 5' – GTC AGC CCC CCG **CAG GTG** GCG GCC GCG GCT - 3' et antisens Δ33-44-AS 5'- AGC CGC GGC CGC **CAC CTG** CGG GGG GCT GAC - 3'; pour Δ61-76, sens Δ61-76-S 5' – GAC AGC GCT CAG **TCG AAC** GGC TAC CCG CCT - 3' et antisens Δ61-76-AS 5'- AGG CGG GTA GCC **GTT CGA** CTG AGC GCT GTC -3'; pour Δ77-88, sens Δ77-88-S 5' – CGC GAG GAC TGG **AAC AAC** GCT GTA GCC CAC - 3' et antisens Δ77-88-AS 5'- GTG GGC TAC AGC **GTT GTT** CCA GTC CTC GCG - 3'; pour Δ89-107, sens Δ89-107-S 5' - GGC GCT GCC GCA **GCC AGC** CCC GCC GAC TAC - 3' et antisens Δ89-107-AS 5'- GTA GTC GGC GGG **GCT GGC** TGC GGC AGC GCC - 3'; pour Δ108-126, sens Δ108-126-S 5' - GCT ATG GGC TAC **AGC GCC** GCG CCG TCC TGC - 3' et antisens Δ108-126-AS 5'- GCA GGA CGG CGC **GGC GCT** GTA GCC CAT AGC - 3'; pour Δ127-142, sens Δ127-142-S 5' – CCG CAC CAT CCG **GCC CCT** CCG GGA CCC GCA - 3' et antisens Δ127-142-AS 5'- TGC GGG TCC CGG **AGG GGC** CGG ATG GTG CGG - 3' (les bases en caractère gras représentent l'endroit où la délétion a été réalisée dans la séquence) (Fig. 12). Les mutants site-spécifiques ont été transférés du vecteur pBATCDX3 par réaction de PCR en remplaçant le site de restriction *AvrII* par *BamHI* : sens BAMH1-CDX3-UP 5'- CCG CGT **GGA TCC** ACC ATG TAC GTG AGC TAC – 3' et anti-sens 180-DOWN-ECOR1 – 5' TCA CTA **GAA TTC** TTA TTG GCT TCC CAG GGA CGG 3' et en conservant la région recouvrant les acides aminés 1 à 180. Les conditions de réaction ainsi que la programmation de l'appareil à PCR ont été les mêmes que mentionnées précédemment. Les fragments obtenus ont

**Figure 12 Liste des mutants de délétion de la séquence codante
de Cdx3**

AH = Alpha helix (hélice alpha)

RC et R = Random Coil (structure surenroulé)

ES = Extended Strand (structure en zig zag)



été vérifiés sur un gel d'agarose 1%, puis digérés avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI. Les fragments ont été purifiés sur colonne Microcon-PCR comme mentionné précédemment et ligaturés au vecteur pGEX 4T2 préalablement digéré par les mêmes enzymes à l'aide du Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada). Les produits de ligation ont été transformés dans les bactéries compétentes *E. coli* TOP-10F' pour vérification des constructions et dans les bactéries compétentes *E. coli* BL-21 Codon + (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). Les bactéries ont été conservées à -80°C dans 50% glycérol. La validité des constructions a été vérifiée par analyse de séquençage (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Calgary, AB, Canada).

9. Production des différentes protéines de fusion GST

Les bactéries *E. coli* BL-21 Codon + ont étéensemencées sur des pétris contenant de l'ampicilline. Le lendemain, une colonie a été sélectionnée et incubée pendant 16 heures à 37°C dans 200 mL de L-Broth (10 mg/mL NaCl, 10 mg/mL Tryptone Peptone, 5 mg/mL extrait de levure, 100 µg/mL ampicilline) sous agitation. Le jour suivant, 48 mL de la culture précédente ont été ajoutés à 1000 mL de LB-ampicilline puis incubés pendant 2 heures à 37°C avec agitation jusqu'au moment d'obtenir une densité de 0.6 à une longueur d'onde de 600 nm. Les bactéries ont été induites 3 heures avec 0.1 mM d'IPTG toujours sous agitation à 37°C. La culture a été centrifugée à 4°C durant 15 minutes à 5000 RPM. Le culot a été lavé 2 fois par centrifugation à 1500 RPM avec du PBS 1X froid et congelé à -80°C. Le jour suivant,

1.2 mL d'une suspension de billes de glutathion-sépharose (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) a été lavé 2 fois avec du tampon de lyse (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM β -glycérophosphate, 50 mM fluorure de sodium, 200 μ M sodium orthovanadate, 5% glycérol, 0.5 μ g/mL aprotinine, 0.5 μ g/mL leupeptine, 0.7 μ g/mL pepstatine et 1 μ M PMSF). Les billes ont été ensuite équilibrées dans 10 mL du tampon de lyse sous agitation à 4°C durant une heure. Les billes ont été centrifugées à 4°C pendant 2 minutes à 1500 RPM pour enlever le surnageant. Durant ce temps, le culot de bactéries a été décongelé et resuspendu dans 8 mL de tampon de lyse sans Triton X-100. Les bactéries ont été soniquées durant 30 secondes et ensuite, 1% Triton X-100 a été ajouté. La suspension bactérienne a été conservée sur glace pendant 10 minutes pour permettre une meilleure solubilisation des protéines. Après une centrifugation à 4°C durant 15 minutes à 13000 RPM, les protéines contenues dans le surnageant ont été ajoutées aux billes de glutathion-sépharose et incubées à 4°C durant 30 minutes sous agitation. Après l'incubation, les billes ont été lavées par centrifugation à 4°C durant 3 minutes à 1500 RPM, 3 fois avec le tampon Triton suivi de 2 fois avec une solution d'HEPES 100 mM pH 7.6. L'HEPES a été enlevé et remplacé par 10 mL de tampon d'élution (50 mM glutathion (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) dans 100 mM HEPES pH 7.6). Les billes et le tampon ont été transférés sur une colonne BioRad (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). La colonne a été incubée à 4°C pendant 16 heures. Le lendemain, les protéines ont été récoltées en fraction de 1 mL et dosées.

10. Essais de précipitation GST

L'essai de précipitation GST a été réalisé tel que décrit précédemment (Houde *et al.*, 2001, Sotelis *et al.*, 2005). Les billes de glutathion-sépharose (40 µL/échantillon) ont été préparées par deux lavages avec le tampon de lyse froid (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM β -glycérophosphate, 50 mM fluorure de sodium, 200 µM sodium orthovanadate, 5% glycérol, 0.5 µg/mL aprotinine, 0.5 µg/mL leupeptine, 0.7 µg/mL pepstatine et 1 µM PMSF), et centrifugées à 1500 RPM durant 2 minutes entre les lavages. Les billes ont été ensuite équilibrées avec 15 µg de protéines de fusion GST pour une heure à 4°C. Elles ont été lavées 3 fois avec le tampon de lyse froid par centrifugation à 1500 RPM durant 3 minutes. 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 15 jours post-confluentes a été ajouté aux protéines GST couplées aux billes et placé sous agitation pour 2 heures à 4°C. Les complexes protéines-billes ont été lavés 3 fois avec le tampon de lyse froid, par centrifugation à 1500 RPM durant 3 minutes. Les complexes protéines-protéines et protéines-billes ont été dénaturés par l'ajout de 40 µL de tampon Laemmli 1X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.9, 2% SDS, 1% β -mercaptoéthanol, 10% glycérol et 0.04% bleu de bromophénol). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation.

11. Extraction des protéines totales

Des boîtes de culture de 60 cm² de cellules Caco-2/15 ont été cultivées à sous-confluence, confluence ou post-confluence. Avant la lyse, les cellules ont été lavées

deux fois avec du PBS 1X et lysées respectivement dans 800 µL, 1.5 mL et 4 mL de tampon de lyse (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 40 mM β-glycérophosphate, 50 mM fluorure de sodium, 200 µM sodium orthovanadate, 5% glycérol, 0.5 µg/mL aprotinine, 0.5 µg/mL leupeptine, 0.7 µg/mL pepstatine et 1 µM PMSF) selon la confluence. Les cellules ont été grattées, placées dans un tube Eppendorf et laissées sous agitation à 4°C durant 15 minutes. Le lysat a été centrifugé à 4°C durant 5 minutes à 13000 RPM et le surnageant contenant les protéines totales a été conservé à -80°C. La concentration en protéines a été ensuite déterminée par la méthode Bradford (BioRad Protein Assay Kit, BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

12. Immunobuvardage de type Western

Les immunobuvardages de type Western ont été réalisés selon la méthode décrite par Laemmli (1970), tel qu'utilisé précédemment (Houde *et al.*, 2001). 15 µg de protéines totales ont été séparés sur gel SDS-PAGE contenant 12% d'acrylamide dans un tampon de migration (0.025 M Tris-HCl, 0.192 mM glycine, 1% SDS) à 150 volts pour approximativement 1 heure 30 minutes. Le marqueur protéique utilisé était le Low Range Prestained SDS-PAGE standard (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Les gels ont été transférés sur une membrane de PVDF dans un tampon de transfert (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycine, 10% éthanol), soit 4 heures à 220 mA ou pour la nuit (16 heures) à 110 mA à 4°C. Les membranes ont été bloquées dans une solution de PBS 1X contenant 5% de lait en poudre écrémé et 0.05% Tween-20.

Les différents anticorps primaires (Tableau 3) ont été incubés pendant 2 heures à température de la pièce selon la dilution appropriée pour chaque anticorps, dans une solution PBS 1X contenant 5% de lait en poudre écrémé et 0.05% Tween-20. Les membranes ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X, contenant 0.05% Tween-20, et ensuite incubées pour 1 heure avec l'anticorps secondaire approprié HRP (Horseradish Peroxidase) (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) dans une solution de PBS 1X contenant 0.05% Tween-20. Les immunocomplexes ont été révélés à l'aide du SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, États-Unis).

Tableau 3 Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Concentration	Anticorps secondaire	Concentration
CDX3 (N. Rivard)	1/20000	Anti-Lapin HRP (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada)	1/10000
Anti-p38 MAP kinase (5F11) (Cell Signaling, Pickering, ON, Canada)	1/1000	Anti-Souris HRP (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada)	1/10000
Anti-Cavéolin (transduction Laboratories, San Diego, CA, États-Unis)	1/1000	Anti-Souris HRP (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada)	1/10000
Anti-Galectin 4 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, États-Unis)	1/1000	Anti-Chèvre HRP (Pierce, Rockford, IL, USA)	1/5000
Anti-Actine (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada)	1/5000	Anti-Souris HRP (Amersham BioSciences, Baie d'Urfé, QC, Canada)	1/10000

13. Essais de phosphorylation *in vitro*

15 µg de protéines de fusion GST couplées à des billes de glutathion-sépharose ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes pour 2 heures à 4°C sous agitation. Les billes avec les protéines ont été lavées 4 fois avec le tampon kinase froid (20 mM para-nitrophényl phosphate (pnpp), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 30 mM HEPES pH 7.4) par centrifugation à 1500 RPM durant 3 minutes. L'essai kinase a été initié par l'ajout de 40 µL de tampon contenant 2 µCi / essai d'ATP [γ -³²P] radioactif avec ou sans SB203580 (Calbiochem, Mississauga, ON, Canada) pour 30 minutes à 30°C. Les billes ont été lavées 2 fois avec le tampon de kinase froid suivi de 2 lavages avec le tampon de lyse par centrifugation à 1500 RPM durant 3 minutes. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 30 µL de tampon Laemmli 1X. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (12% acrylamide) pour environ 1 heure 30 minutes à 150 volts. Le gel a été coloré à l'aide du Bleu de Coomassie, séché et exposé dans une cassette à autoradiographie avec un écran et un film BioMax MR. Comme contrôle négatif, la protéine GST seule a été utilisée. Comme contrôle positif, la portion 1-180 de Cdx3 de type sauvage a été utilisée.

14. Préparation des constructions rétrovirales

Le gène Cdx3 a été transféré dans le vecteur pBABEpuro (Gheorghiu *et al.*, 2001). Le vecteur pBATCDX3 a été digéré par *AvrII* et *EcoRI*. Le fragment de 939 bp correspondant à Cdx3 a été isolé et purifié en utilisant les colonnes Microcon-PCR.

Les extrémités ont été remplies avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase durant 30 minutes pour créer des bouts francs. Le vecteur pBABEpuro a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *Sna*BI et incubé à 60°C pour 30 minutes afin d'inactiver l'enzyme. Les fragments obtenus ont été ligaturés dans le vecteur pBABEpuro (Rapid DNA Ligation Kit, Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) durant 20 minutes à température de la pièce afin de dériver le plasmide pBABECDX3. Les produits de ligation ont été transformés dans les bactéries compétentes TOP 10F' *Escherichia coli* (Clontech, Mississauga, ON, Canada). L'orientation a été vérifiée par digestion à l'aide d'enzymes de restriction et de séquençage (University Core DNA & Protein Services, University of Calgary, Calgary, AB, Canada).

15. Production des rétrovirus

La transfection des constructions pBABEpuro et pBABECDX3 a été réalisée dans la lignée cellulaire HEK 293T dans des boîtes de culture de 60 cm² à 70% de confluence. Le milieu des cellules a été remplacé une heure avant la transfection par 4 mL de milieu complet. Les cellules ont été transfectées par lipofection. La LIPOfectamine 2000 (15 µL de LIPOfectamine 2000 par 500 µL d'Opti-MEM) a été incubée dans le milieu Opti-MEM à température ambiante pour 5 minutes (Mélange A). Le mélange contenant la construction pBABEpuro ou pBABECDX3 a été préparé en utilisant 3 µg d'ADN des différentes constructions dans 500 µL d'Opti-MEM pour 500 µL du mélange A. 3 µg du vecteur pAMPHO (don de A. Nepveu, Université McGill) permettant l'expression des protéines rétrovirales a été ajouté au mélange. Le

mélange contenant les ADNs a été ajouté au même volume de mélange A, agité et incubé à température de la pièce pendant 20 minutes. Le mélange contenant la LIPOfectamine 2000 et l'ADN a été ajouté directement dans le milieu. Sept heures après la transfection, le milieu a été changé (6 mL). 48 heures plus tard, le milieu a été récupéré et filtré à l'aide d'un filtre de 0.45 µm avec faible liaison pour les protéines (Millipore, Bedford, MA, USA), et conservé à -80°C en aliquots de 1.5 mL.

16. Infections rétrovirales

Les infections rétrovirales ont été réalisées dans les cellules de la crypte intestinale de rat IEC-6, tel que décrit précédemment (Gheorghiu *et al.*, 2001). 1.5 mL de milieu filtré contenant les virus et 4 µg de polybrène (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été ajouté à 5 mL d'une boîte de 60 cm² à 80% de confluence, et laissé pour 24 heures à 37°C dans un environnement contenant 5% de CO₂. Le milieu a été changé par 8 mL de milieu frais et laissé pour 24 heures. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X, trypsinisées et divisées en deux boîtes de culture de 60 cm² avec du milieu DMEM 5% FBS contenant 1.5 µg/mL de puromycin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pour sélectionner les cellules. La sélection s'est effectuée sur environ 2 semaines. Ensuite, la population de cellules résistantes a été conservée et testée pour l'expression du gène de Cdx3 par immunofluorescence et par immunobuvardage de type western.

17. Extraction des ARN totaux

Des extraits d'ARN totaux ont été préparés en utilisant les cellules IEC-6 (boîte de culture 60 cm²) infectées par le vecteur vide pBABEpuro et pBABECDX3, tel que décrit précédemment (Gheorghiu *et al.*, 2001) selon la méthode d'extraction au guanidinium isothiocyanate (Chomczynski *et al.*, 1997) avec le réactif TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Les cellules ont été lavées 3 fois avec 3 mL de PBS 1X, grattées dans 1 mL de PBS 1X et placées dans un tube Eppendorf stérile. Les cellules ont été centrifugées durant 5 minutes à 2000 RPM. Le culot a été resuspendu dans 800 µL du réactif TRIZOL, mélangé à l'aide d'une micropipette et incubé 5 minutes à température ambiante. 160 µL de chloroforme-alcool isoamyl 24 : 1 a été ajouté. Le mélange a été agité durant 15 secondes et incubé 3 minutes à température ambiante, avant d'être centrifugé à 4°C durant 15 minutes à 13000 RPM. Le surnageant a été transféré dans un tube stérile auquel 0.5 mL d'isopropanol a été ajouté et ensuite agité vigoureusement. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, les tubes ont été centrifugés à 4°C durant 10 minutes à 13000 RPM. Les culots ont été lavés avec 1 mL d'éthanol 70% et conservés à -80°C jusqu'au moment de l'utilisation où ils ont été centrifugés à 4°C durant 5 minutes à 13000 RPM et resuspendus dans un volume d'eau stérile.

18. Analyse par micropuces d'ADN

Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont été cultivées jusqu'à confluence. L'ARN cellulaire total a été extrait avec le TRIZOL. Pour l'analyse par micropuces d'ADN,

10 µg de l'ARN extrait ont été utilisés pour la synthèse de l'ADN complémentaire, suivi de la réverse transcription *in vitro* pour créer de l'ADNc marqué à la biotine à l'aide d'une amorce du promoteur T7 possédant une queue poly (T). L'ADNc a été alors hybridé sur une micropuce (Affimetrix rat gene chip RAE230A) représentant 31,000 transcrits. L'ADNc cible a alors été coloré à la streptavidine-phycoérythrine, suivi de l'analyse des micropuces à l'aide du module de criblage GeneArray à une longueur d'onde de 488 nm. L'analyse de données, de la moyenne, des différences et de l'expression de chaque élément présent sur les micropuces a été obtenue à l'aide du programme « Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) » avec les différents paramètres établis (Plate-forme de micropuces à ADN, Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill). La classification des gènes selon les processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués a été produite à l'aide du programme « Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) » (<http://apps1.niaid.nih.gov/david/>).

19. Transcription inverse suivie de PCR

5 µg d'ARN totaux et 1 µg d'oligo dT dans 20 µL d'eau DEPC ont été incubés pendant 10 minutes à 70°C suivi de 3 minutes à 4°C. 1 µL de 10 mM de dNTP et 6 µL de tampon de réaction 5X pour la réverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) ont été ajoutés et le volume complété à 30 µL avec de l'eau DEPC. Le mélange fut placé 3 minutes à 37°C. 2 unités de la réverse transcriptase AMV (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) ont été ajoutés au mélange incubé par la suite à 37°C pendant 1 heure. Une réaction de PCR a été

réalisée sur l'ARN complémentaire obtenu en utilisant les mêmes conditions que celles mentionnées dans le tableau 1. Les résultats ont été observés par migration sur un gel d'agarose 1%. Pour les différents gènes étudiés, les amorces suivantes ont été utilisées, pour la phospholipase A2 l'amorce sens PHOSPHOA2-S 5' – CTG GAG TTT GGG CAA ATG AT – 3' et anti-sens PHOSPHOA2-AS 5' – TGG AGA GGG GTG TTT TCT TG – 3'; pour la galectine-4 sens LECTIN-S 5' – AGA AGA GCA TGC CTT TCC AA – 3' et anti-sens LECTIN-AS 5' – GTT GCG AAC CAC ACA ATC AC – 3'; pour la LBP-S sens 5' – CCG GTA ACC TTG CTG TTG TT - 3' et anti-sens LBP-AS 5' – ACC TCT GAC CTG CAG CCT TA - 3'; synthénine sens SYNTHENINE-S 5' – GAA CTA CAT GGT AGC ACC TGG GAC - 3' et SYNTHENINE-AS 5' – TCG CTA TGG ATG TGA TTT TTC CAC - 3'; pour comme contrôle l'actine sens ACTINE-S 5' – CAT GAA ACT ACA TTC AAT TCC ATC A - 3' et anti-sens ACTINE-AS 5' – ATG ATC TTG ATC TTC ATG GTG CTA - 3'. Tous les oligonucléotides ont été déterminés par l'utilisation du site internet PRIMER3 ver. 2.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>).

20. Immunofluorescence

Les cellules IEC-6 ont étéensemencées sur des lamelles de verre placées dans des plaques de culture de 6 puits. À sous-confluence et à confluence, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS 1X puis fixées durant 20 minutes avec de la paraformaldéhyde (PFA) 3% dissoute dans du PBS 1X à pH 7.2. Les cellules ont été lavées 2 fois pendant 10 minutes au PBS 1X suivi d'une perméabilisation de 15 minutes avec 0.1% Triton X-100 dissout dans du PBS 1X. Trois lavages de 5 minutes

au PBS 1X ont été suivis d'un blocage au « bovine serum albumin » (BSA) 2% dissout dans du PBS 1X. L'incubation avec l'anticorps primaire anti-CDX3 NR à une dilution de 1/200 a été réalisée pendant 1 heure 30 minutes à température de la pièce, suivie de 3 lavages au PBS 1X. L'incubation avec l'anticorps secondaire anti-lapin Alexa 488 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), à une dilution de 1/1000, a été réalisée pendant 30 minutes à température de la pièce et à l'obscurité. Les lamelles ont été finalement lavées 3 fois avec du PBS 1X et préparées pour observation par microscopie.

21. Purification des radeaux lipidiques

Quatre boîtes de culture de cellules IEC-PURO et IEC-CDX3 à différents temps de post-confluence ont été lavées 3 fois avec du PBS froid. 1 mL de PBS a été ajouté par boîte de culture et les cellules ont été grattées, placées dans un tube Eppendorf et centrifugées à 3000 RPM durant 5 minutes. Les cellules ont été ensuite lysées dans 600 µL de tampon de lyse (25 mM MES, 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.5 µg/mL aprotinin, 0.5 µg/mL leupeptin, 0.7 µg/mL pepstatin et 1 µM PMSF), solubilisées 15 minutes à 4°C et passées à l'homogénéisateur 8 fois. 500 µL a été prélevé, mélangé avec 1.5 mL de sucrose 80% (80% sucrose, 25 mM MES, 150 mM NaCl pH 6.5) pour une concentration finale de 60%, et placé dans le fond d'un tube pour gradient. Un gradient de sucrose a été créé avec les concentrations suivantes : 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% et le fond avec le 60% fait précédemment, avec des volume de 1.4 mL pour chaque fraction. Les tubes ont été centrifugés à 4°C durant 18 heures à

35000 RPM dans une centrifugeuse Beckman avec un rotor SW-41ti. Des fractions de 1 mL ont été récupérées, dosées et conservées à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

22. Dosage de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline

Afin de doser l'activité de la phosphatase alcaline dans les fractions obtenues par isolation des radeaux lipidiques, 100 µL du lysat a été ajouté à 1 mL de substrat (0.5 µM para-nitrophényl phosphate) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Le mélange a été ensuite incubé à 37°C durant 30 minutes ou jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune. Ensuite, les échantillons ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 410 nm pour en révéler l'activité.

23. Analyse des résultats

Tous les résultats obtenus pour les essais luciférase représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes produites en quadruplicata. Les barres d'erreur ont été évaluées en fonction de la déviation standard de 3 expériences indépendantes représentatives effectuées en quadruplicata. La significativité des résultats a été vérifiée par des tests de *student* à l'aide du logiciel Graph Pad. Pour les figures de gel de rétention, d'essais kinases et d'immunobuvardage de type western, les images utilisées sont représentatives d'au moins 3 expériences indépendantes. Les résultats obtenus par immunofluorescence, sont des photos représentatives d'au moins 3 expériences individuelles.

Résultats

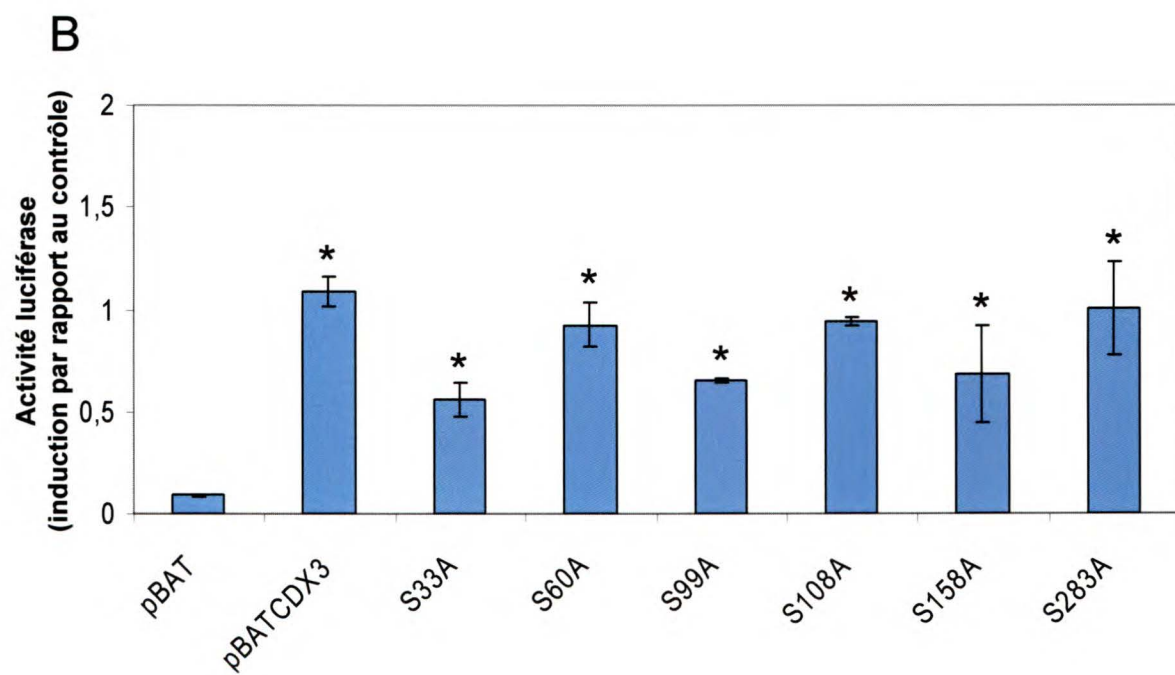
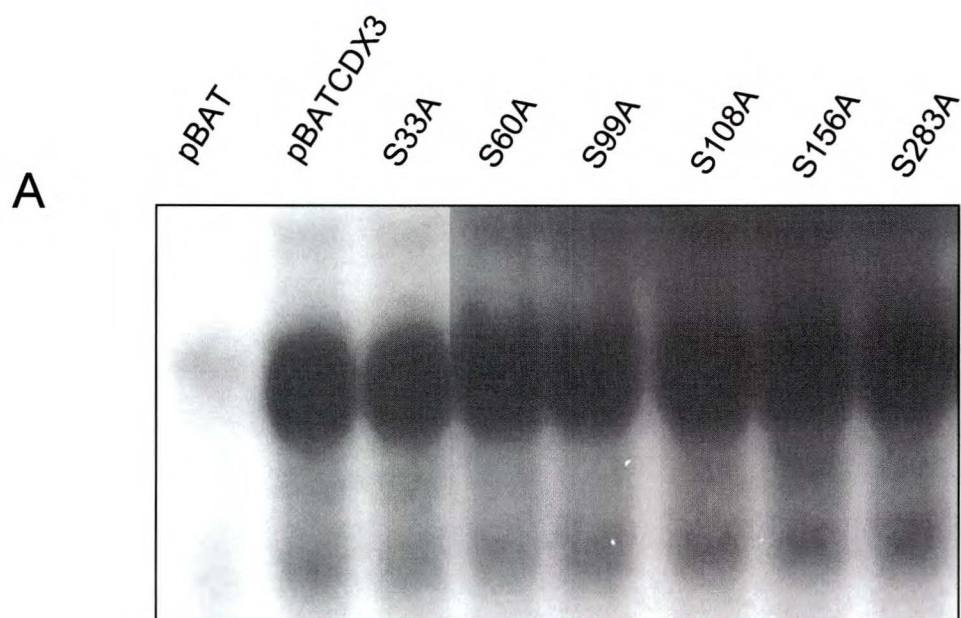
1. Les mutants S33A, S99A et S156A de Cdx3 présentent une activité transcriptionnelle réduite.

Pour identifier le site de phosphorylation de la MAP kinase p38 α sur Cdx3, des mutants site-spécifiques de sites putatifs de phosphorylation par les MAPKs ont été créés. En étudiant la séquence de Cdx3, 6 sérines se trouvant dans une séquence sérine suivie d'une proline ont été mutées en alanine pour empêcher la phosphorylation. Celles-ci ont été nommées selon la nomenclature suivante, par exemple S33A pour la sérine 33 mutée en alanine. La liste des sérines mutées est la suivante : S33A, S60A, S99A, S108A, S156A et S283A. Des gels de rétention ont été réalisés afin de vérifier la capacité de liaison à l'ADN des différentes mutations. La sonde oligonucléotidique SIF1 marquée radioactivement au ^{32}P , correspondant à une séquence retrouvée sur le promoteur de la sucrase-isomaltase reconnue par Cdx3, a été incubée avec des extraits de protéines nucléaires de cellules 293T préalablement transfectées avec les différents mutants. Le résultat de l'incubation a été appliqué sur un gel de polyacrylamide et la liaison des différents mutants au niveau de la sonde a été vérifiée. Dans la figure 13A, peu importe la mutation, aucune perte de liaison ou modification majeure de la liaison à SIF1 n'est observable. Pour vérifier l'effet de ces différentes mutations sur l'activité de la protéine Cdx3, des essais de transfections transitoires suivis d'essais luciférase dans les cellules Caco-2/15 nouvellement confluentes ont été pratiqués. Le gène rapporteur SILuc contenant une portion du promoteur de la sucrase-isomaltase couplé au gène de la luciférase a été utilisé. Dans

Figure 13. Les mutants S33A, S99A et S156A de Cdx3 présentent une activité transcriptionnelle réduite.

A) Capacité de liaison à l'ADN des mutants Cdx3. Les cellules 293T ont été transfectées de façon transitoire pendant 24 h avec la LIPOfectamine 2000 et les constructions contenant différents mutants site-spécifiques, soit pBAT (contrôle négatif, vecteur vide), pBATCDX3 (contrôle positif, Cdx3 de type sauvage), les mutants S33A, S60A, S99A, S108A, S156A et S283A. 5 µg d'extrait nucléaire ont été incubés avec la sonde SIF1. La solution de réaction a été chargée sur un gel de polyacrylamide. Les protéines ayant la capacité de lier la sonde sont retenues dans le haut du gel avec la sonde tandis que la sonde non liée est retrouvée dans le bas du gel.

B) Effet des différents mutants site-spécifiques sur la capacité de transactivation de Cdx3. Les cellules Caco-2/15 presque confluentes (jour -1), ont été transfectées avec le gène rapporteur SILuc contenant la portion -183 à +54 du promoteur de la sucrase isomaltase couplé au gène de la luciférase et les vecteurs d'expression pBAT (contrôle négatif, vecteur vide), pBATCDX3 (contrôle positif, Cdx3 de type sauvage), les mutants S33A, S60A, S99A, S108A, S156A et S283A. 48 h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée à l'aide d'un luminomètre. Le contrôle positif (pBATCDX3) a été utilisé comme valeur de référence 1.0. Les barres d'erreurs ont été évaluées en fonction de la déviation standard de 6 expériences indépendantes représentatives effectuées en quadruplicata par rapport au contrôle avec le vecteur vide (* = $p \leq 0.001$).



la figure 13B, on observe qu'avec les mutations des sérines 33, 99 et 156, l'activité transcriptionnelle de Cdx3 au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase est réduite respectivement de 49%, 40% et 36%. Des études ultérieures pratiquées par un collègue nous ont permises de vérifier que cette diminution d'activité n'est pas due à une diminution de stabilité des différents mutants (résultats non montrés).

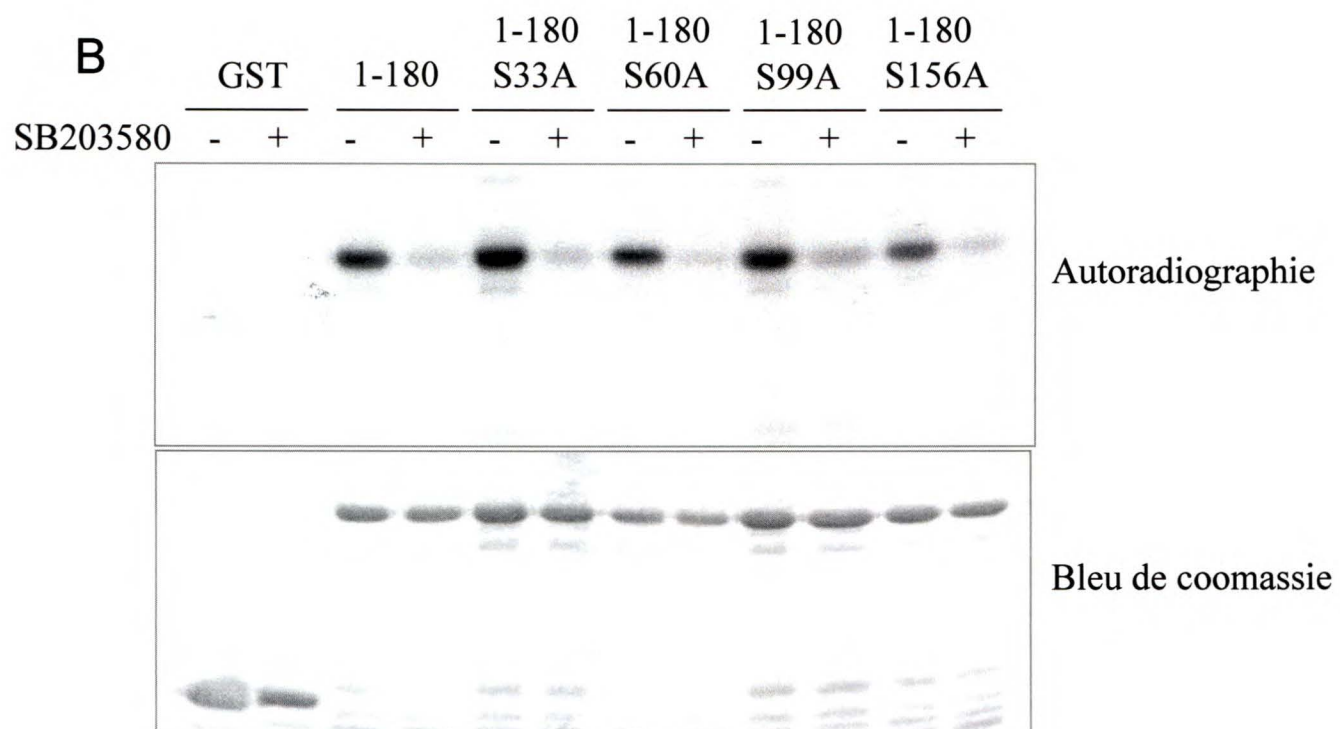
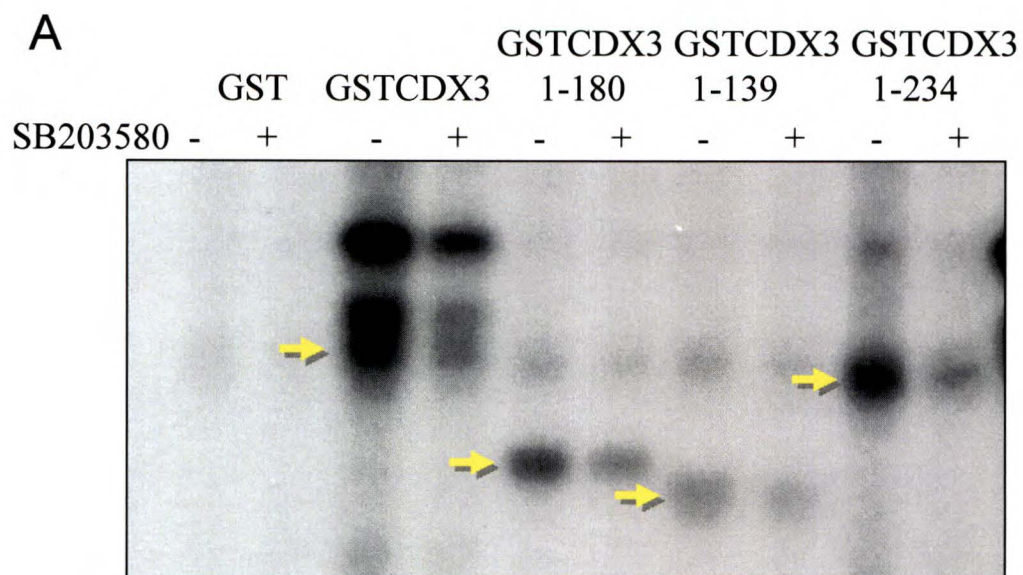
2. La sérine 156 de Cdx3 pourrait être un site de phosphorylation de la MAP kinase p38 α .

Dans le but de déterminer les sites de phosphorylation de la MAP kinase p38 α , nous avons d'abord créé des fusions entre la glutathion S-transférase et des régions recouvrant le domaine N-terminal de Cdx3 (acides aminés 1-180, 1-139 et 1-234). Les protéines de fusion ont été produites et incubées avec des extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes, pour un essai de phosphorylation *in vitro* avec de l'[ATP]³²P en présence ou en absence de l'inhibiteur spécifique de la MAP kinase p38, le SB203580. Les résultats montrent une réduction de la phosphorylation dépendante de p38 dans le domaine de transactivation de Cdx3. On observe aussi une réduction du niveau de phosphorylation sans inhibiteur, de la région entre les acides aminés 1-139, par rapport à la région recouvrant les acides aminés 1-180. Si on compare les séquences, on remarque que la seule sérine retrouvée dans l'intervalle entre les acides aminés 139-180 est la sérine 156 (Fig. 14A).

Pour vérifier l'importance des différentes sérines dans la phosphorylation de Cdx3 par la MAP kinase p38 α , des essais de précipitation GST avec des extraits totaux de

Figure 14. L'addition de l'inhibiteur SB203580 diminue la phosphorylation de la région N-terminale de Cdx3.

A) *Effet du SB203580 sur la phosphorylation de Cdx3.* 15 µg de protéines de fusion GST (contrôle négatif), GSTCDX3 (contrôle positif, Cdx3 de type sauvage), GSTCDX3 1-234, GSTCDX3 1-180 et GSTCDX3 1-139 ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes, pour un essai de phosphorylation de 30 min en présence de 5 µCi d'ATP [γ - 32 P] et 20 µM de SB203580 ou DMSO (contrôle). Les produits de la réaction kinase ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et l'activité kinase a été révélée par autoradiographie. Les expériences ont été réalisées 3 fois. **B)** *Effet du SB203580 sur la phosphorylation des mutants site-spécifiques de Cdx3.* 15 µg de protéines de fusion GST (contrôle négatif), Cdx3 1-180 (contrôle positif), 1-180 S33A, 1-180 S60A, 1-180 S99A et 1-180 S156A ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes, pour un essai de phosphorylation de 30 min en présence de 5 µCi d'ATP [γ - 32 P] et 20 µM de SB203580 ou DMSO (contrôle). Les produits de la réaction kinase ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et l'activité kinase a été révélée par autoradiographie. Les expériences ont été réalisées 3 fois.



cellules Caco-2/15 post-confluentes suivis d'essais de phosphorylation *in vitro* ont été pratiqués dans les mêmes conditions que mentionnées ci-dessus. Différentes constructions de la portion 1-180 de Cdx3 fusionnée à la GST, contenant les mutations des différentes sérines (33, 60, 99, 108 et 156), ont été produites. On remarque pour tous les mutants, une diminution du niveau de phosphorylation après addition du SB203580 (Fig. 14B). Les niveaux de phosphorylation sans inhibiteur sont aussi fortement réduits par la mutation de la sérine 156 en alanine.

Pour vérifier la sensibilité au SB203580 de Cdx3 comparativement au mutant S156A, des essais de phosphorylation *in vitro* en présence de différentes concentrations de SB203580 ont été effectués. La diminution de phosphorylation entre les concentrations 0.1 et 1 μ M de SB203580 pour le mutant S156A 1-180 présente une diminution nettement moins prononcée que celle obtenue avec le Cdx3 1-180, suggérant que cette sérine est effectivement phosphorylée par la MAP kinase p38 α (Fig. 15A et B).

3. Les acides aminés 61 à 76 de Cdx3 sont importants dans la liaison de la MAP kinase p38 α .

Afin d'identifier le site de liaison de la MAP kinase p38 α sur Cdx3, nous avons produit une série de mutants de délétion (Δ 37-44, Δ 61-76, Δ 77-88, Δ 89-107 et Δ 127-142) en comparant les homologues de Cdx3 du hamster et du poisson zèbre (Fig. 16). Chaque délétion correspond soit à une portion conservée, soit à une portion non

Figure 15. Une mutation de la sérine 156 rend Cdx3 moins sensible à l'action de l'inhibiteur de la MAP kinase p38, le SB203580.

A) *Sensibilité de la phosphorylation du mutant S156A en présence de différentes concentrations de SB203580.* 15 µg de protéines de fusion GST (contrôle négatif), 1-180 (contrôle positif) et 1-180 S156A ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes pour un essai de phosphorylation de 5 min en présence de 5 µCi d'ATP [γ - 32 P] et de différentes concentrations de SB203580 (0.1, 1, 5, 10 et 20 µM) ou DMSO (contrôle). Les produits de la réaction kinase ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et l'activité kinase a été révélée par autoradiographie. Comme contrôle de quantité lors du chargement, le gel a été coloré au bleu de Coomassie. **B)** Graphique de la densitométrie obtenue avec l'expérience d'essai kinase à l'aide du logiciel ImageQuant TL Version 2005 distribué par Amersham Biosciences. **C)** *Mesure du niveau de phosphorylation du mutant S156A comparativement à celui de Cdx3.* 15 µg de protéines de fusion GSTCDX3 1-180 (contrôle positif) et 1-180 S156A ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes pour un essai de phosphorylation de 5 min en présence de 5 µCi d'ATP [γ - 32 P] et 20 µM de SB203580 ou DMSO (contrôle). Les produits de la réaction kinase ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et l'activité kinase a été révélée grâce à un FXmager de BioRad. Les études de densitométrie ont été réalisées à l'aide du logiciel Quantity One 4.4.0 Build 036 distribué par BioRad.

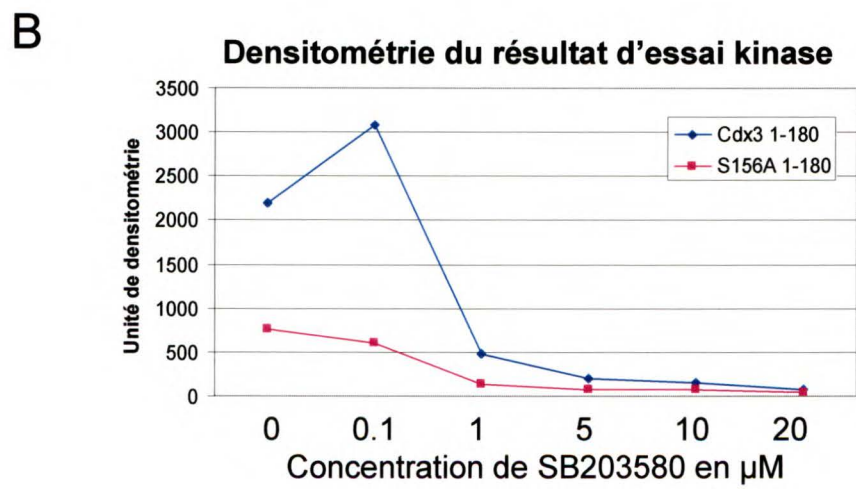
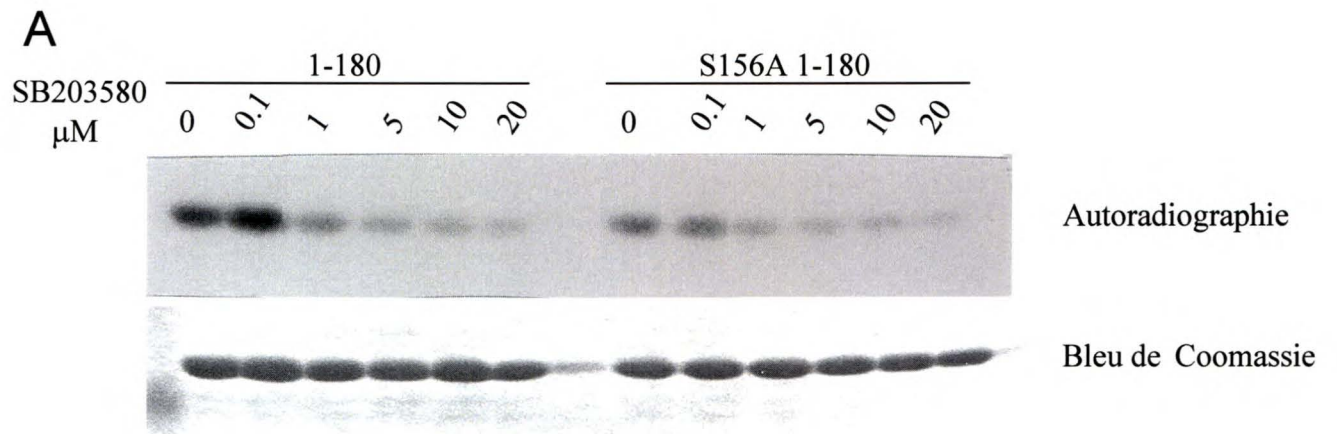


Figure 16. Comparaison entre les séquences de Cdx2

Réalisée à l'aide du logiciel Peptool distribué par BTI Software.

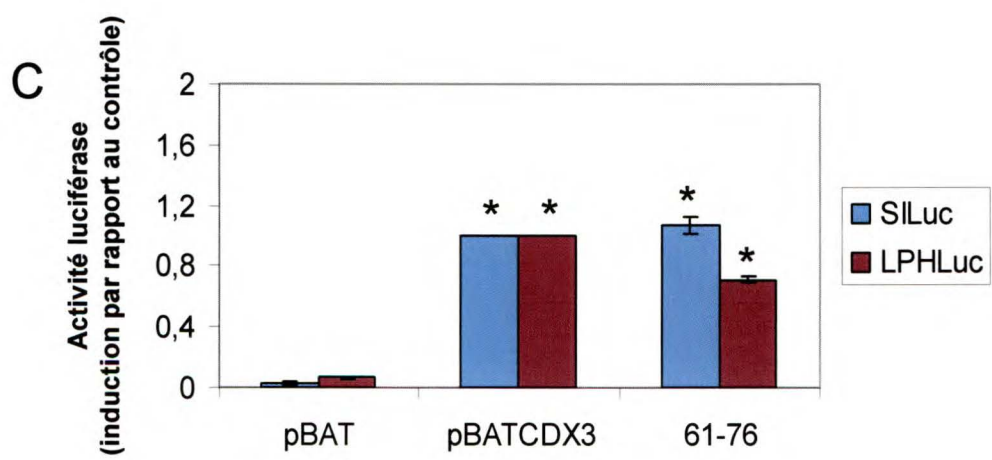
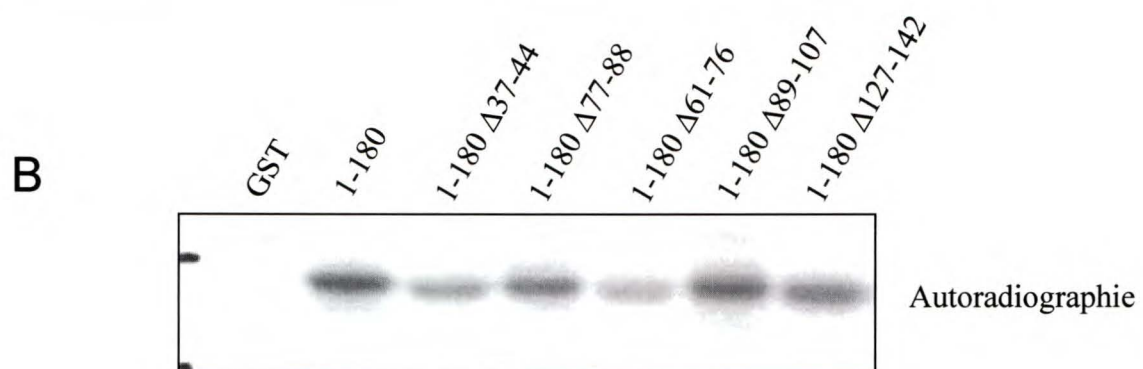
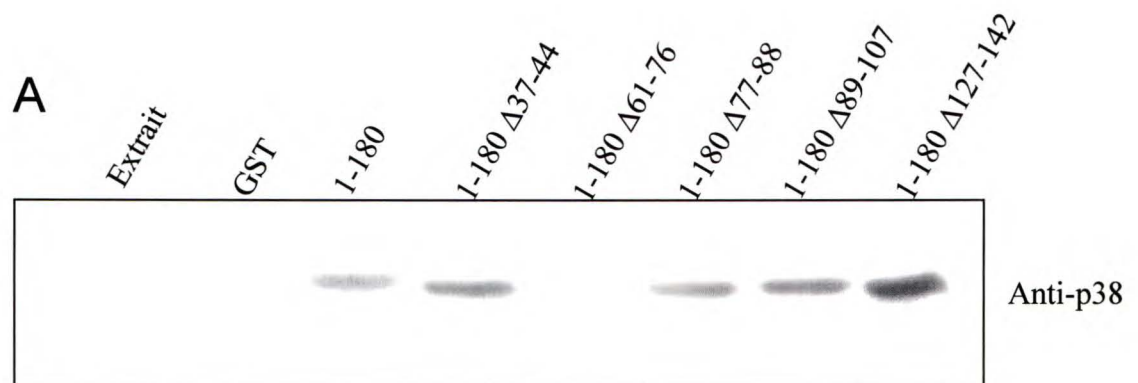
Consensus	MYVSYLLDKDVSMYPSSVRHSGGLNLAPQNFVSPQYPDYGGYHVAAAAA	50
Hamster	MYVSYLLDKDVSMYPSSVRHSGGLNLAPQNFVSPQYPDYGGYHVAAAAA	50
Souris	MYVSYLLDKDVSMYPSSVRHSGGLNLAPQNFVSPQYPDYGGYHVAAAAA	50
Humain	MYVSYLLDKDVSMYPSSVRHSGGLNLAPQNFVSPQYPDYGGYHVAAAAA	50
Poisson	MSVSYLLDT--AMYGNPARHLN-LSQPHLNVPYSAFYPDYSGYHPGPAIG	47
	<div>Δ37 - 44</div>	
Consensus	A-ANLDSAQSPGPSW--AYCAPLREDWNGY-PG--AAAAANAVAHGLNGGS	94
Hamster	AAANLDSAQSPGPSWSTAYCAPLREDWNGYPPG-GAAAAANAVAHGLNGGS	99
Souris	ATANLDSAQSPGPSWPTAYCAPLREDWNGYAPG-GAAAAANAVAHGLNGGS	99
Humain	AAANLDSAQSPGPSWPAAYCAPLREDWNGYAPGCAAAAAANAVAHGLNGGS	100
Poisson	-----NDLHHTGSSWSPGFCGCSRDDWP-----PLYCHGTCHSL	81
	<div>Δ61 - 76 Δ77 - 88 Δ89 - 107</div>	
Consensus	PAAAMGYSSPA-YH-HHHPHHHPHHPAA-PSCASGLLQTLN-GPPGPAAT	140
Hamster	PAAAMGYSSPADYHAHHHPHHHPHHPAAAPSCASGLLQTLNPGPPGPAAT	149
Souris	PAAAMGYSSPAFYHAHHHPHHHPHHPAAAPSCASGLLQTLNLGPPGPAAT	149
Humain	PAAAMGYSSPADYHPHHHPHHHPHHPAAAPSCASGLLQTLNPGPPGPAAT	150
Poisson	PANGVEVS-----VLPSVDQGLLSCAPVD-----	105
	<div>Δ108 - 126 Δ126 - 142</div>	
Consensus	-AAEQLSP-GQRRNLCEWMRKPAQ-SLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHQRLE	187
Hamster	GAAEQLSPSGQRRNLCEWMRKPAQPSLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHQRLE	199
Souris	AAAEQLSPSGQRRNLCEWMRKPAQPSLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHQRLE	199
Humain	AAAEQLSPSGQRRNLCEWMRKPAQPSLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHQRLE	200
Poisson	-----REEPQDWMRRSAVPTN-PGCKTRTKDKYRVVYSDVQRLE	143
Consensus	LEKEFH-SRYITIRRKAEALATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKINKK--Q	234
Hamster	LEKEFHYSRYITIRRKAEALATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKINKKKLQ	249
Souris	LEKEFHFSRYITIRRKSELAATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKIKKK--Q	247
Humain	LEKEFHYSRYITIRRKAEALATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKINKKK-L	249
Poisson	LEKEFHFSRYITIRRKAEALAGTLNLSESRQVKIWFQNRRAKERKMNKKRLQ	193
Consensus	QQQQQQQ--Q---PPPQP-QPQPG-LRSVPEPLSPV-SLQ-SV-GSVPCV	274
Hamster	QQQQQQQQQLASPPPPQPSQPQPGSLRSVPEPLSPVSSLQGSVPGSVPCV	299
Souris	QQQQQQQQQQPPPPPPQPSQPQPGALRSVPEPLSPVTSLQGSVPGSVPCV	297
Humain	QQQQQQQQPPPPPPPPPPQPPQPGPLRSVPEPLSPVSSLQASVSGSVPCV	299
Poisson	QVQQQLQRSCKHHHCQQLRQRLDDRQYLQLHQRCILKTLRFQRNSSCLHS	243
Consensus	LGP-GCVLN-TVTQ--	286
Hamster	LGPAGCVLNPTVTQ--	313
Souris	LGPAGCVLNSTVTQ--	311
Humain	LGPTGCVLNPTVTQ--	313
Poisson	FSDTEQWTTSYCTILH	259

conservée entre les deux espèces. Nous avons vérifié la capacité de ces mutants de lier la MAP kinase p38 α par essais de précipitation GST en utilisant des extraits de cellules Caco-2/15 post-confluentes. Nous avons déterminé par immunobuvardage de type western l'interaction avec la MAP kinase p38 α . La MAP kinase p38 α interagit avec la portion 1-180 de Cdx3 et non la GST seule (Fig. 17A). L'interaction est conservée avec tous les mutants, sauf la délétion des acides aminés 61-76 où aucune liaison n'a été observée.

Par essai de phosphorylation *in vitro*, nous avons observé une réduction de phosphorylation du mutant Δ 61-76 et du mutant Δ 37-44 comparativement aux autres mutants suggérant que la perte de la liaison de la MAP kinase p38 α affecte aussi le niveau de phosphorylation (Fig. 17B). Nous avons comparé les niveaux d'activation transcriptionnelle de Cdx3 et du mutant Δ 61-76 par transfections transitoires suivies d'essais luciférase dans les cellules Caco-2/15 confluentes, de trois promoteurs, soit le promoteur de la sucrase-isomaltase (SILuc), celui de la lactase phlorizine hydrolase (LPHLuc) et celui du sérum amyloïde A (SAALuc). Le gène rapporteur SAALuc a été utilisé comme contrôle, puis que celui-ci ne possède pas d'élément de liaison pour les protéines Cdx, afin vérifier que Cdx3 n'a pas d'activité non-spécifique sur le vecteur contenant les gènes rapporteurs luciférase (non présentés). Alors que la délétion 61-76 n'a pas effet sur la capacité de transactivation de Cdx3 au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase, une diminution de 40% de la capacité de transactivation de Cdx3 sur LPHLuc est observée avec la délétion 61-76 (Fig. 17C).

Figure 17. Les acides aminés 61-76 sont importants pour l'activation transcriptionnelle médiée par Cdx3.

A) *Les acides aminés 61-76 de Cdx3 sont importants pour la liaison de la MAP kinase p38.* 15 µg de protéines de fusion GST (contrôle négatif), Cdx3 1-180 (contrôle positif), 1-180 Δ37-44 , 1-180 Δ61-76, 1-180 Δ77-88, 1-180 Δ89-107 et 1-180 Δ127-142 ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes pour réaliser une précipitation GST. Les complexes obtenus ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide 12%, transférés sur une membrane de PVDF et analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps monoclonal spécifique à la MAP kinase p38. Comme contrôle positif, 15 µg d'extraits totaux des cellules Caco-2/15 ont été utilisés. **B)** *Une délétion des acides aminés 37-44 et 61-76 réduit la phosphorylation de Cdx3.* 15 µg de protéines de fusion GST (contrôle négatif), Cdx3 1-180 (contrôle positif), 1-180 Δ37-44 , 1-180 Δ61-76, 1-180 Δ77-88, 1-180 Δ89-107 et 1-180 Δ127-142 ont été incubées avec 1 mg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 post-confluentes pour un essai de phosphorylation de 30 min en présence de 5 µCi d'ATP [γ - 32 P]. Les produits de la réaction kinase ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et l'activité kinase a été révélée par autoradiographie. **C)** *La délétion des acides aminés 61-76 de Cdx3 réduit l'activation transcriptionnelle du promoteur du gène LPHLuc.* Les cellules Caco-2/15 sous-confluentes ont été transfectées avec le gène rapporteur SILuc et LHPLuc et les vecteurs d'expression pBAT (contrôle négatif), pBATCDX3 (contrôle positif) et Δ61-76. 48 h après la transfection, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été mesurée avec un luminomètre. Le contrôle positif (pBATCDX3) a été utilisé comme valeur de référence 1.0. Les barres d'erreurs ont été évaluées en fonction de la déviation standard de 3 expériences indépendantes représentatives effectuées en quadruplicata par rapport au contrôle avec le vecteur vide (* = $p \leq 0.005$).



4. La surexpression de Cdx3 dans la lignée IEC-6 induit une modulation au niveau de l'expression génique de ces cellules.

Afin de mieux comprendre le rôle de Cdx3 dans la différenciation intestinale épithéliale, nous avons cloné le gène Cdx3 dans le vecteur rétroviral pBABEpuro et nous avons établi une lignée cellulaire intestinale épithéliale de rat surexprimant Cdx3. La lignée cellulaire IEC-CDX3 surexprime bien la protéine, tel que déterminé par immunobuvardage de type western avec un anticorps reconnaissant de manière spécifique Cdx3 (Fig. 18A). Alors que l'expression de Cdx3 est maintenue à sous-confluence et à confluence, les niveaux de Cdx3 diminuent après l'atteinte de la confluence (Fig. 18B). L'immunofluorescence indirecte montre la localisation nucléaire de Cdx3 dans la lignée IEC-CDX3 (Fig. 18C).

Nous avons ensuite utilisé des micropuces d'ADN représentant 31,000 gènes de rat, afin de mesurer les différences d'expression créées par la surexpression de Cdx3. Nous avons comparé les niveaux d'expression en triplicata de cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 confluentes. L'analyse des résultats obtenus a démontré que 309 gènes sont augmentés d'au moins 2 fois par l'ajout de Cdx3 dans les cellules IEC-6 et 753 gènes sont diminués d'au moins 2 fois (Fig. 19A). Pour vérifier la validité des résultats obtenus, des extraits d'ARN des cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont été isolés afin de vérifier l'expression de certains gènes cibles par RT-PCR. Les gènes utilisés sont les suivants : phospholipase A2 (augmenté de 50.9 fois), lectin galactose binding protein (galectine-4) (augmenté de 34.5 fois), lipopolysaccharide binding protein (LBP) (augmenté de 5.5 fois), et synthénine (augmenté de 1.5 fois). Les

Figure 18. Cdx3 est exprimé dans les cellules IEC-6 infectées avec le vecteur rétroviral pBABECDX3.

A) 15 µg d'extraits totaux de cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 confluentes ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12%, transférés sur une membrane de PVDF et analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps polyclonal spécifique pour Cdx3. Comme contrôle de quantité, un anticorps monoclonal reconnaissant l'actine a été utilisé. **B)** *Expression de Cdx3 selon la confluence.* 15 µg d'extraits totaux de cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 à différents stades de confluence (sous-confluente, confluente et 7 jours, 14 jours et 21 jours post-confluente) ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12%, transférés sur une membrane de PVDF et analysés par immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps polyclonal spécifique pour Cdx3. **C)** *Localisation nucléaire de Cdx3.* Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont été cultivées à sous-confluence pour réaliser des immunofluorescences indirectes. Les cellules ont été marquées avec le DAPI pour délimiter les noyaux et avec un anticorps polyclonal reconnaissant de manière spécifique Cdx3. Les photos possèdent un coefficient de grossissement de 63X.

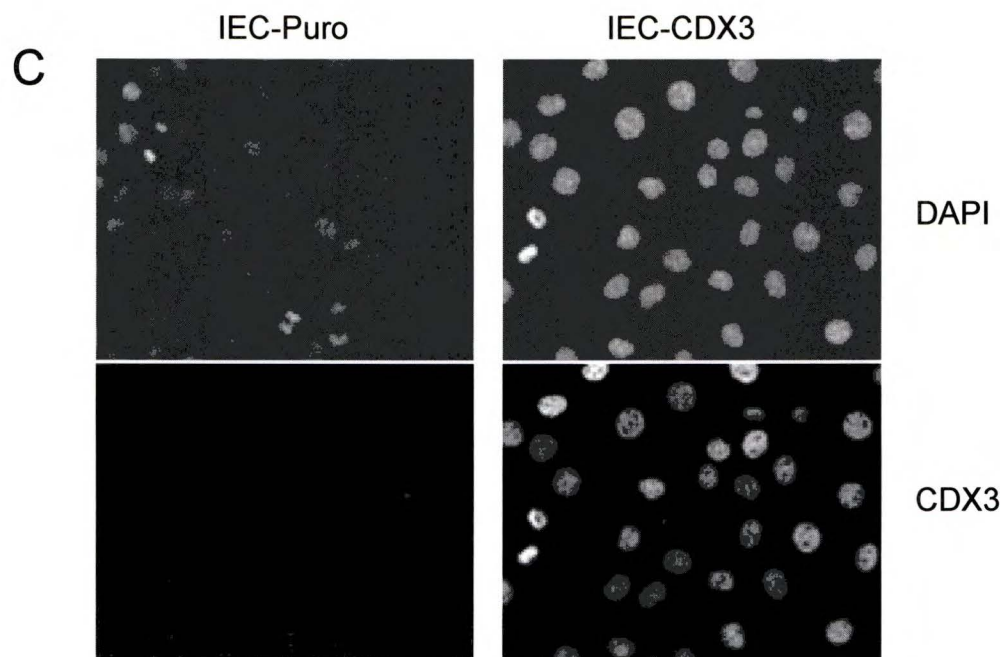
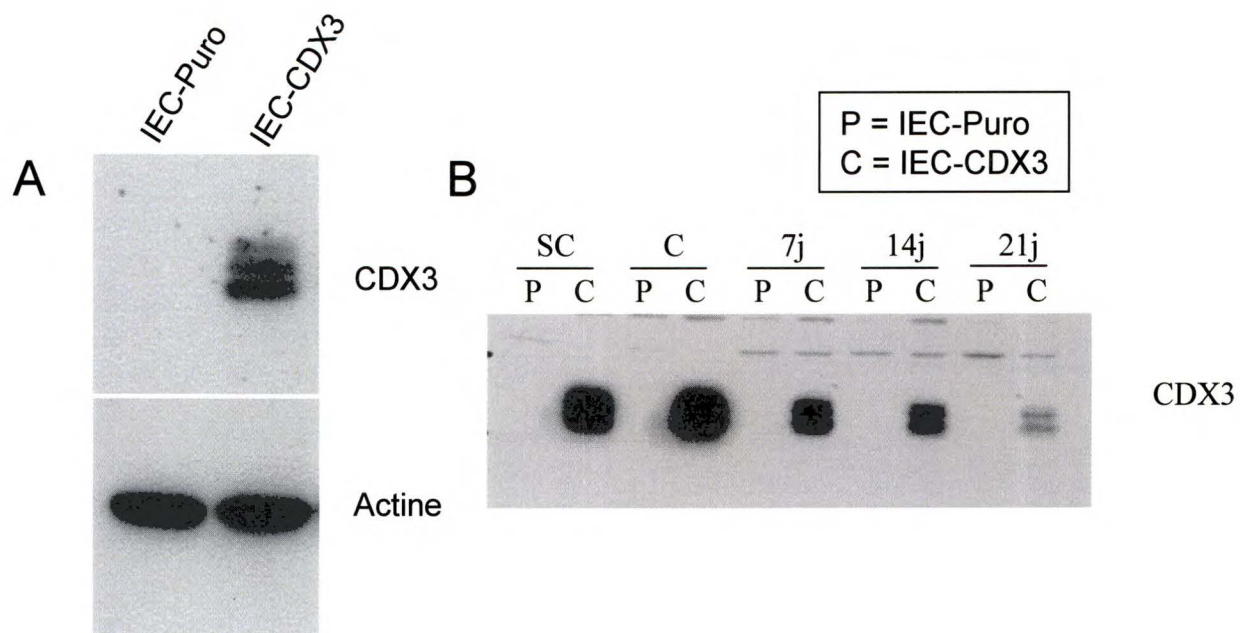
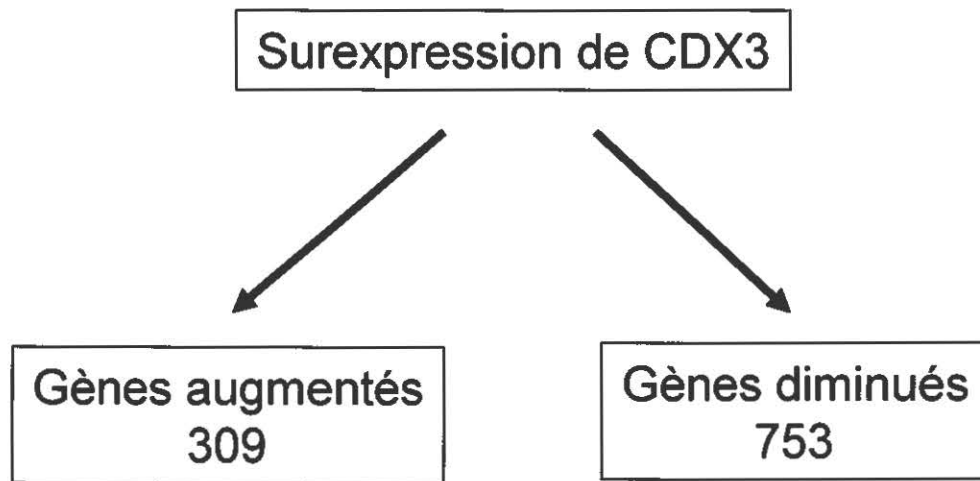


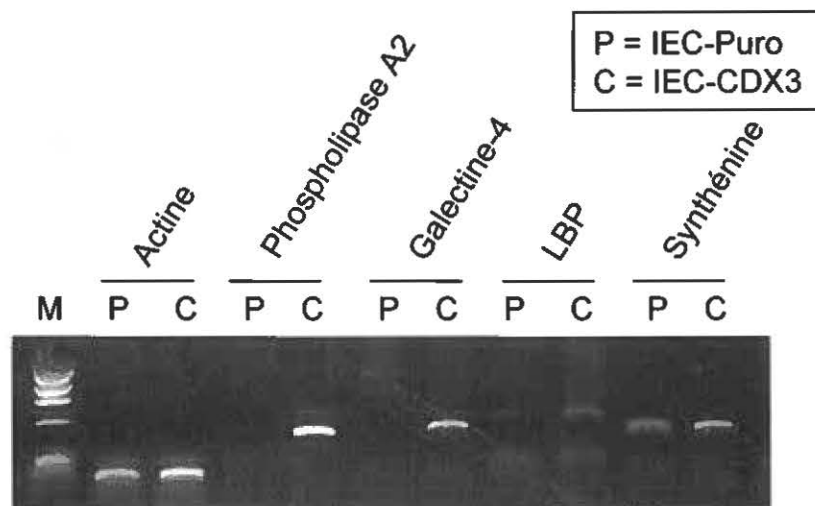
Figure 19. Influence de Cdx3 sur l'expression génomique dans les cellules IEC-6.

A) *Distribution des gènes influencés par la surexpression de Cdx3.* Représentation schématique du nombre de gènes induits et réprimés plus de 2 fois par la surexpression de Cdx3 dans les cellules IEC-6. **B)** *Validation des résultats obtenus avec les micropuces ADN.* Des extraits d'ARN des cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 confluentes ont été utilisés pour une réaction de transcription inverse suivie d'un PCR en utilisant les amorces pour amplifier une partie des gènes suivants : actine (comme contrôle), phospholipase A2, galectine 4, lipopolypotein binding protein (LBP) et la synthénine. Les résultats de ces amplifications ont été chargés sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium et analysés par visualisation sous une lampe UV.

A



B



résultats démontrent une induction de la phospholipase A2, de la galectine-4 et de la LBP en corrélation avec les résultats des micropuces (Fig. 19B). L'expression de la synthénine est légèrement augmentée si l'on normalise avec le contrôle actine, ce qui est en accord avec l'induction de 1.5 fois calculée avec les micropuces.

Parmi les gènes induits, on retrouve trois gènes impliqués dans l'interaction ou l'adhésion entre cellules comme la galectine-4 (34.5 fois), la cadhérine 2 (12 fois) et l'occludine (7.2 fois) (Tableau 4). On remarque aussi une augmentation d'expression des apolipoprotéines telles que l'apolipoprotéine A-I (12.6 fois), l'apolipoprotéine E (11.9 fois) et l'apolipoprotéine B (5.1 fois). Une autre protéine intéressante est la lipopolysaccharide binding protein (LBP) qui est induite de 5.5 fois. Celle-ci est intéressante car elle pourrait démontré une implication de Cdx2 dans la réponse inflammatoire. À l'aide du logiciel DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery) disponible sur le site du NIH, nous avons classifié les gènes induits plus de 5 fois selon le processus biologique : dix sont impliqués dans la croissance et le maintien cellulaire, quatre dans la transduction de signal, trois dans le métabolisme des lipides, deux dans l'adhésion cellulaire et un dans le métabolisme xénobiotique (Tableau 5). Le tableau 6 montre les gènes induits plus de 5 fois et leur classification. Par exemple, l'hephaestin, le LBP, la phospholipase A2 et la furine (celle-ci est induite de 1.5 fois) se retrouvent dans la classe la plus importante « croissance et maintien cellulaire ». Le gène LBP est aussi retrouvé dans les classes « réponse aux stimuli extracellulaires » et « métabolisme des xénobiotiques ». La galectine-4 se retrouve dans la classe « adhésion cellulaire », étant donné son rôle

Tableau 4. Liste des gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6.

Analyse par micropuces d'ADN des gènes induits plus de 5 fois dans les cellules IEC-CDX3 confluentes. Les signaux émis suite à trois différentes expériences ont été analysés avec le programme Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) et exprimés en niveau d'induction en comparaison de celui des cellules infectées avec le vecteur vide pBABEpuro.

Accession	Nom du gène	Induction
NM_031598	phospholipase A2 group IIA (platelets synovial fluid)	50,9
AI406290	protein kinase lysine deficient 4	38,5
NM_012975	lectin galactose binding soluble 4	34,5
NM_022513	dopa/tyrosine sulfotransferase	29,4
NM_012892	amiloride-sensitive cation channel 1	20,3
BF552733	guanine nucleotide binding protein gamma 2	17,4
NM_019278	regulated endocrine-specific protein 18	17,0
NM_017233	4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	16,8
NM_012738	apolipoprotein A-I	12,6
NM_031333	cadherin 2	12,0
J02582	apolipoprotein E	11,9
NM_022960	aquaporin 9	10,9
U46118	cytochrome P450 3A9	10,8
NM_133304	hephaestin	10,7
NM_031972	aldehyde dehydrogenase family 3 member A1	10,2
NM_012488	alpha-2-macroglobulin	9,9
AI412938	G protein-coupled receptor 56	9,5
AI598434	endothelial PAS domain protein 1	9,4
NM_019291	carbonic anhydrase 2	9,3
AF129400	FXRD domain-containing ion transport regulator 2	8,7
NM_133536	RAB3C member RAS oncogene family	7,7
BG662519	progressive ankylosis	7,7
AI638971	occludin	7,2
NM_053372	secretory leukocyte protease inhibitor	7,1
AF193015	serine proteinase inhibitor clade I (neuroserpin) member 1	7,1
AA799627	selenoprotein P plasma 1	7,0
BI293393	crystallin lamda 1	6,8
NM_053594	protein tyrosine phosphatase receptor type R	6,6
M29853	cytochrome P450 subfamily 4B polypeptide 1	6,4
AI137640	claudin 1	6,4
NM_053543	neurochondrin	6,1
NM_057129	trefoil factor 1	6,1
NM_053535	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	6,0
AI408948	carbonic anhydrase 2	5,9
AF140346	secreted frizzled-related protein 4	5,6
BF289368	lipopolysaccharide binding protein	5,5
NM_031646	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	5,3
BF396597	apolipoprotein B	5,1

Tableau 5. Classification des gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6.

Analyse par micropuces d'ADN des gènes induits plus de 5 fois dans les cellules IEC-CDX3 confluentes. Les signaux émis suite à trois différentes expériences ont été analysés à l'aide du programme Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) et exprimés en niveau d'induction en comparaison de celui des cellules infectées avec le vecteur vide pBABEpuro. Les processus biologiques associés aux gènes induits au moins 5 fois ont été identifiés avec la banque de données « Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery » (DAVID).

Classement obtenu pour les gènes augmentés par l'expression de Cdx3.

Classes	Nombre de gène
Croissance et maintenance	10
Transduction de signal	4
Métabolisme des lipides	3
Organogenèse	3
Réponse aux stimuli extracellulaires	3
Catabolisme	2
Digestion	2
Adhésion cellulaire	2
Métabolisme des nucléotides	2
Métabolisme des composés à un carbone	2
Réponse aux stress	2
Métabolisme des alcools	1
Métabolisme des amines	1
Métabolisme des acides aminés	1
Métabolisme des composés aromatiques	1
Transport des électrons	1
Organisation de la matrice extracellulaire	1
Réponse immunitaire	1
Métabolisme des acides organiques	1
Métabolisme du phosphore	1
Métabolisme des protéines	1
Métabolisme xénobiotique	1
Non classés	16

Tableau 6. Liste d'une sélection de gènes induits par Cdx3 dans les cellules IEC-6.

Analyse par micropuces d'ADN des gènes induits plus de 5 fois dans les cellules IEC-CDX3 confluentes. Les processus biologiques associés aux gènes induits au moins 5 fois ont été identifiés à l'aide de la banque de données « Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery » (DAVID).

[illegible]

entre autre dans le ciblage au pôle apical des radeaux lipidiques des cellules de la bordure en brosse (Delacour *et al.*, 2005).

5. L'expression de Cdx3 entraîne une augmentation de l'adhésion des cellules IEC-6.

Les résultats des micropuces montrent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire. Nos observations des cellules surexprimant Cdx3 montrent une plus grande capacité d'adhésion inter-cellulaire. Afin de vérifier l'effet de Cdx3 sur l'adhésion entre les cellules et le substrat, nous avons ensemencé les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 dans des pétris pour la culture en suspension, non traités. Alors que les cellules IEC-Puro adhèrent peu au pétri de culture, les cellules IEC-CDX3 interagissent entre elles avant de s'agglomérer assez rapidement (non montré). Par la suite, les agglomérats adhèrent dans le fond du pétri et le colonisent rapidement jusqu'à l'atteinte de la confluence (Fig. 20). Par microscopie en temps réel, on observe aussi que les cellules surexprimant Cdx3 possèdent une plus grande capacité de migration permettant de couvrir rapidement la totalité du pétri de culture (non montré).

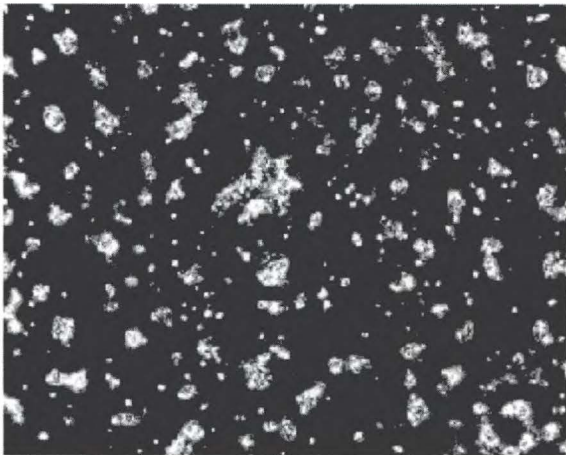
6. L'expression de la galectine-4 augmente selon le niveau de différenciation des cellules intestinales épithéliales.

Nous avons montré que l'expression de la galectine-4, impliquée entre autre dans l'adhésion cellulaire, était augmentée dans les cellules IEC-CDX3. Nous avons

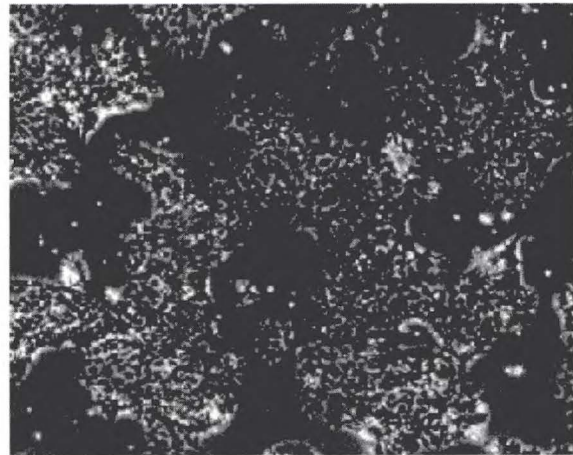
Figure 20. L'expression de Cdx3 entraîne une augmentation de l'adhésion des cellules IEC-6.

Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont étéensemencées en quantité égale dans des pétris de 20 cm² pour la culture en suspension, non traités. 48 h après l'ensemencement, les cellules ont été observées par microscope à fond clair et des photos ont été prises à différents grossissements.

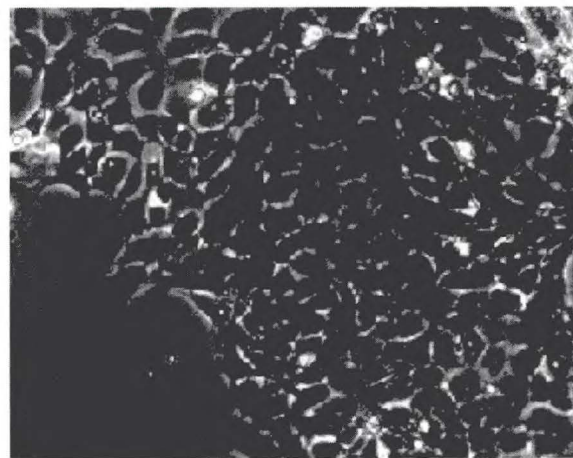
IEC-Puro



IEC-CDX3



5X



20X

mesuré l'expression de la galectine-4 par immunobuvardage de type western à partir d'extraits des cellules IEC-Puro et IEC-CDX3. Comme l'ARNm, les niveaux protéiques de galectine-4 corrélaient parfaitement avec les niveaux de Cdx3 (Fig. 21A). Les niveaux protéiques de Cdx3 et de la galectine-4 sont aussi augmentés dans les cellules Caco-2/15 lors de leur processus de différenciation, à post-confluence (Fig. 21B).

7. La galectine-4 est localisée uniformément dans les cellules IEC-CDX3.

Afin d'identifier la localisation de la galectine-4, nous avons réalisé des immunofluorescences indirectes sur les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 à sous-confluence. La galectine-4 est détectée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules IEC-CDX3, contrairement aux cellules IEC-Puro (Fig. 22). En effet, alors que Cdx3 est exclusivement nucléaire, la galectine-4 se retrouve uniformément dans la cellule (Fig. 22).

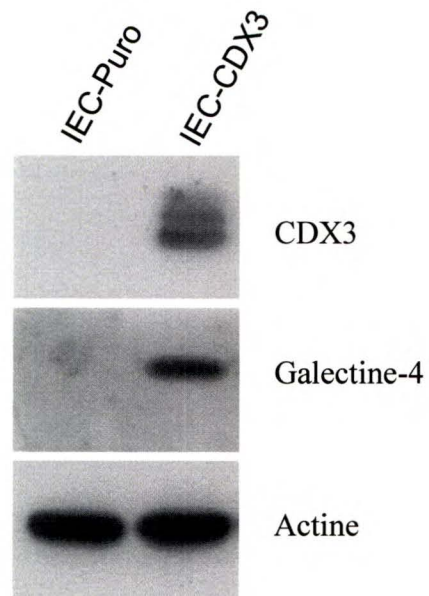
8. La galectine-4 est retrouvée dans les radeaux lipidiques des cellules IEC-6 surexprimant Cdx3 qui se différencient.

La galectine-4 joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire grâce à deux domaines CRD qui permettent de faire des liens entre deux sucres retrouvés au niveau de la membrane de différentes cellules (Ideo *et al.*, 2005). La galectine-4 se retrouve aussi dans les entérocytes différenciés au niveau des radeaux lipidiques permettant

Figure 21. Expression de la galectine-4 dans les cellules IEC-CDX3 et Caco-2.

A. 15 µg d'extraits totaux des cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 confluentes ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et transférés sur une membrane de PVDF afin de réaliser des études d'immunobuvardages de type western. Les immunobuvardages ont été effectués à l'aide d'anticorps reconnaissant la galectine-4, Cdx3 et l'actine comme contrôle de chargement. **B.** 15 µg d'extraits totaux de cellules Caco-2/15 à différents stades de confluence (sous-confluentes (SC), confluentes (C) et post-confluentes (7 jours et 14 jours)) ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 12% et transférés sur une membrane de PVDF. Des immunobuvardages de type western utilisant des anticorps reconnaissant de manière spécifique la galectine-4, Cdx3 et l'actine comme contrôle de chargement ont été effectués.

A



B

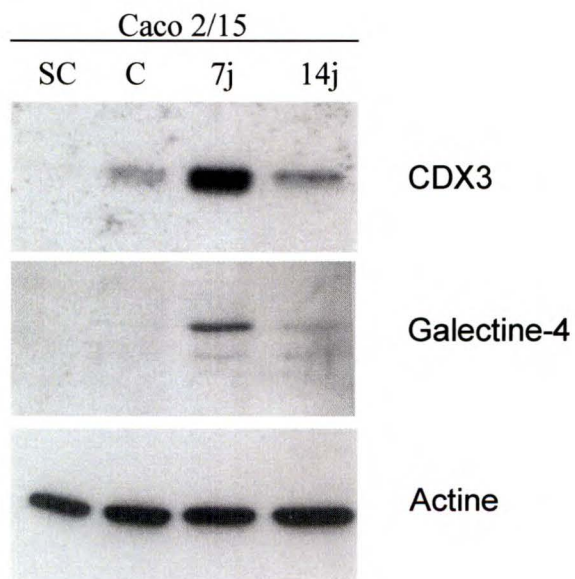
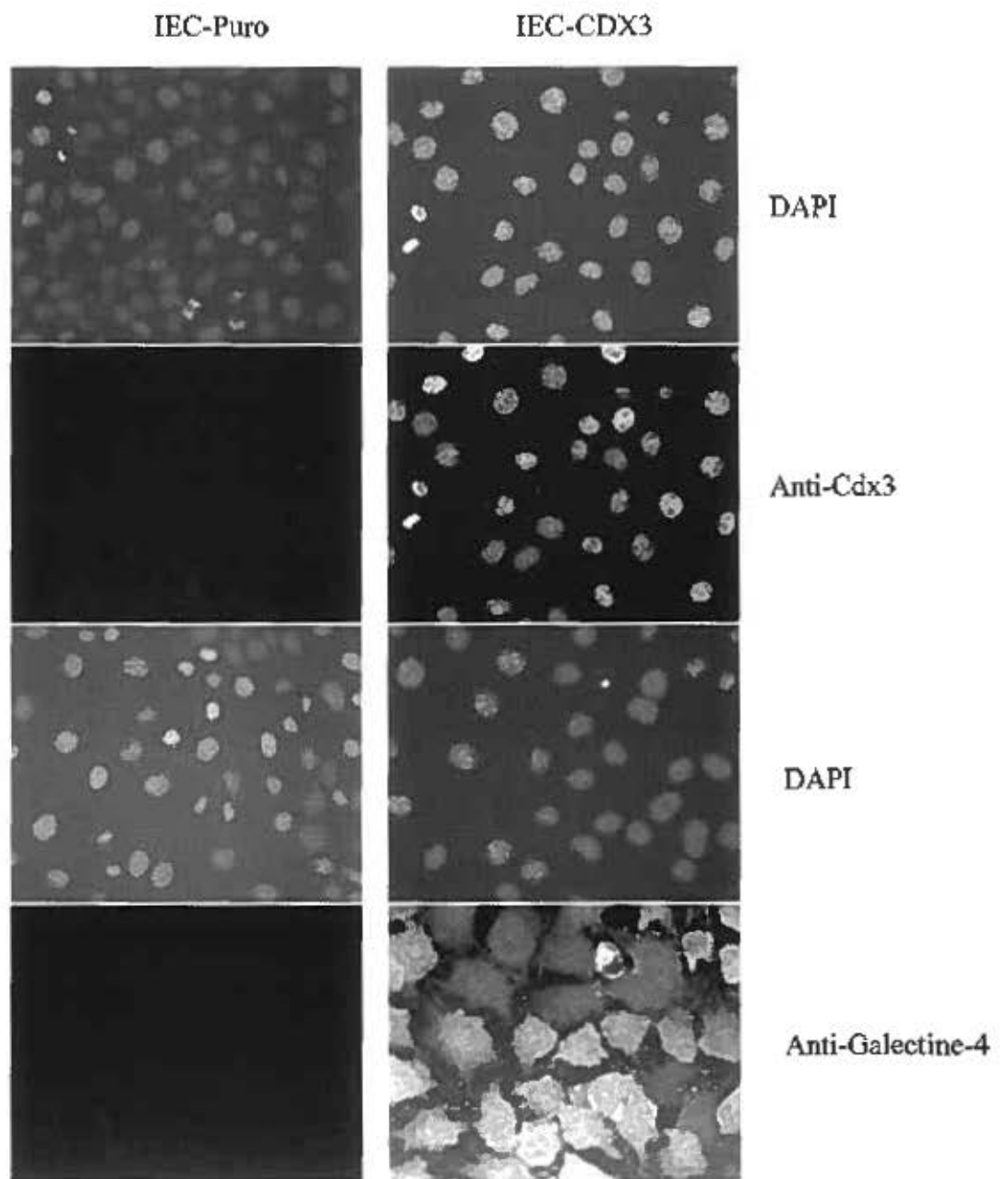


Figure 22. La galectine-4 est localisée uniformément dans les cellules IEC-CDX3.

Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont étéensemencées dans des pétis de 20 cm² contenant des lamelles de verre. Les cellules sous-confluentes adhérees à la lamelle ont ensuite été utilisées pour réaliser une immunofluorescence indirecte avec un anticorps reconnaissant Cdx3 et la galectine-4. Comme marqueur de noyaux, une coloration au DAPI a été utilisée.



ainsi leur stabilisation et leur migration vers la membrane apicale (Delacour *et al.*, 2005). Nous avons purifié par gradient de sucrose, les radeaux lipidiques des cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 à différents stades de post-confluence afin de déterminer la localisation de la galectine-4 et d'un marqueur de radeaux lipidiques, la cavéoline 1. Le principe de cette technique de purification est basé sur la propriété des radeaux lipidiques de flotter selon leur densité dans le gradient de sucrose. Les résultats montrent que les radeaux lipidiques se retrouvent principalement au niveau des fractions 4 à 7, tel que démontré par immunobuvardage et détection de la cavéoline 1 (Fig. 23). La galectine-4 n'est pas détectée dans les cellules IEC-Puro. Par contre, alors que la galectine-4 est détectée dans les cellules IEC-CDX3 post-confluentes au niveau des fractions provenant du fond du gradient (7 à 12), sa distribution dans les radeaux lipidiques augmente selon le temps de confluence des cellules IEC-CDX3.

Afin de vérifier le degré de maturité des radeaux lipidiques, nous avons mesuré l'activité d'une enzyme maturée dans les radeaux, soit la phosphatase alcaline (Braccia *et al.*, 2003). L'activité de la phosphatase alcaline a été dosée dans les fractions lipidiques obtenues de cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 à 85 jours post-confluence. Alors qu'aucune activité n'est décelable dans les cellules IEC-Puro, une bonne activité enzymatique est détectée dans les fractions 5 à 7 obtenues des cellules IEC-CDX3 (Fig. 24). Ces résultats suggèrent que l'expression de Cdx3 mène à une spécialisation des radeaux lipidiques comme ceux retrouvés au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales épithéliales différenciées. En ce qui concerne l'apparition d'un deuxième pic dans les fractions du fond, celui-ci est peut

Figure 23. La différenciation des cellules IEC-CDX3 mène à une redistribution de la galectine-4 dans les radeaux lipidiques.

Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont été cultivées à différents stades de post-confluentes (34 jours et 85 jours). Afin de préparer les radeaux lipidiques, les cellules ont été lysées de façon mécanique et chargées dans le fond d'un gradient de sucrose. Après une centrifugation de 18 heures à 4°C à 39000 rpm, des fractions de 1 ml ont été recueillies. 40 µL de chaque fraction ont été chargés sur un gel de 12% polyacrylamide et transférés sur une membrane de PVDF pour effectuer des essais d'immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques pour la galectine-4 et la cavéoline 1, un marqueur de radeaux lipidiques.

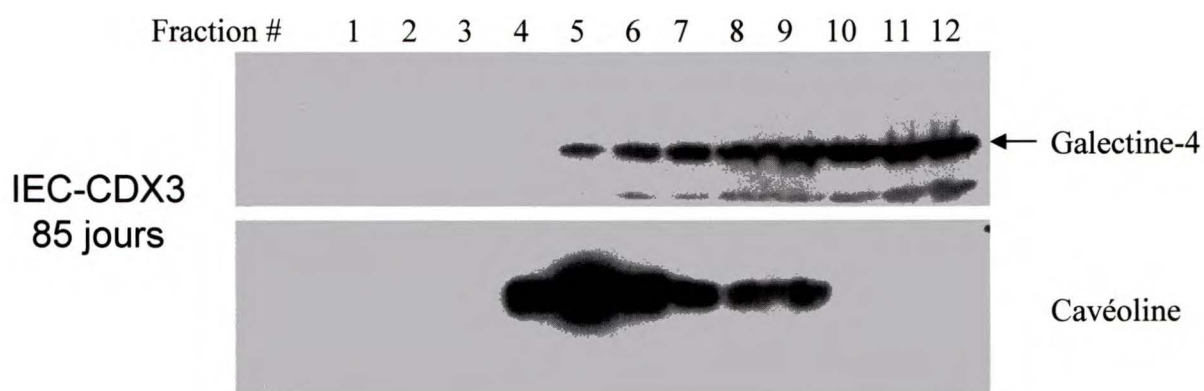
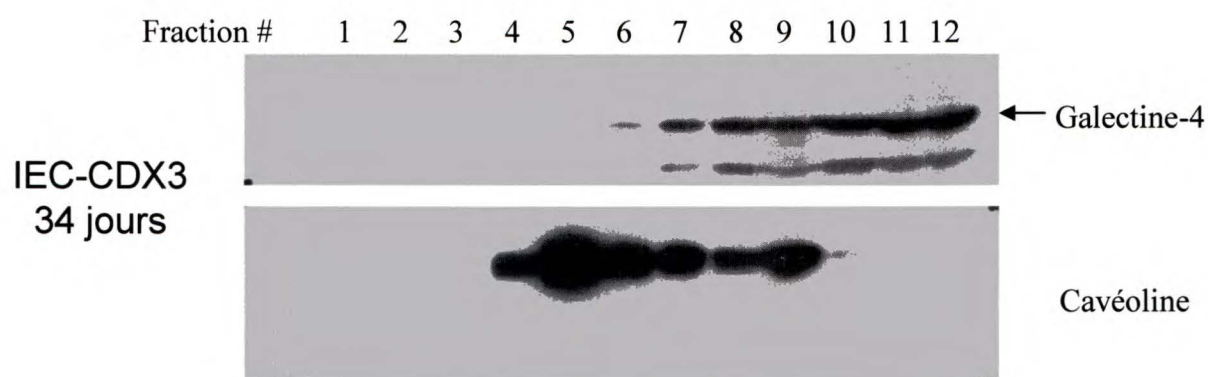
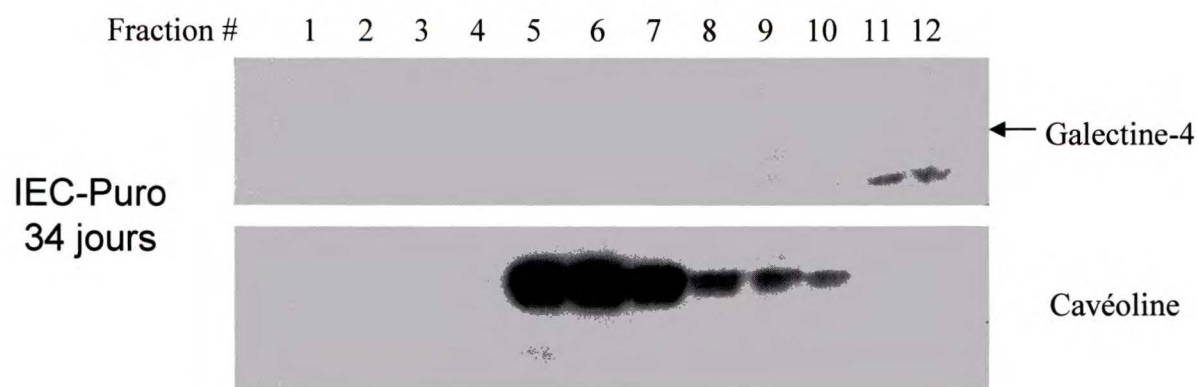
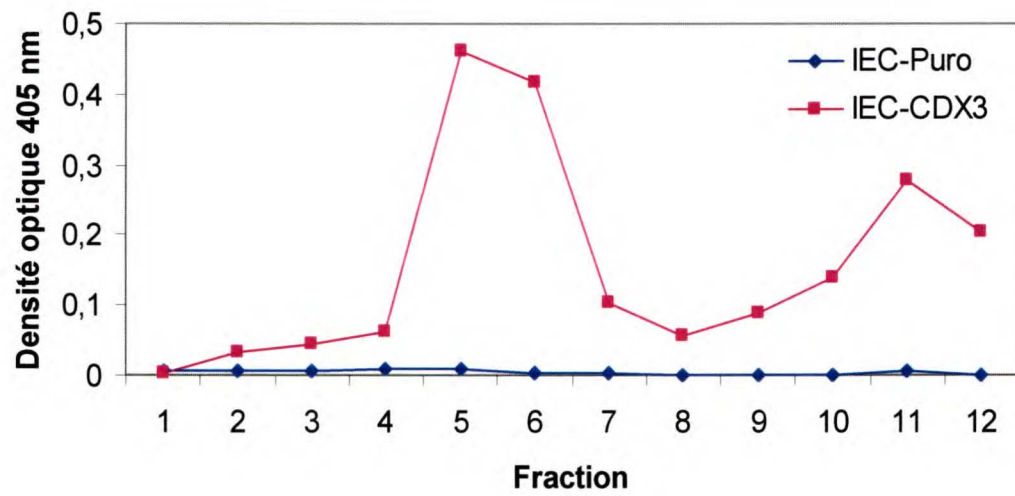


Figure 24. La phosphatase alcaline se retrouve dans les radeaux lipidiques des cellules IEC-CDX3.

Les cellules IEC-Puro et IEC-CDX3 ont été cultivées à différents stades de post-confluence 85 jours. Afin de préparer les radeaux lipidiques, les cellules ont été lysées de façon mécanique et chargées dans le fond d'un gradient de sucrose. Après une centrifugation de 18 heures à 4°C à 39000 rpm, des fractions de 1 ml ont été recueillies. 100 µL de chaque fraction ont été utilisés pour doser l'activité de la phosphatase alcaline.

Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline



être du au fait que Cdx3 induit le processus mais nécessite l'implication de d'autres facteurs, ceci reste à être vérifié.

Discussion

1. La MAP kinase p38 α lie Cdx2 au niveau des acides aminés 61 à 76 et phosphoryle la sérine 156.

Les MAP kinases font partie d'une famille de protéines kinases phosphorylant de manière spécifique des sérines ou thréonines suivies d'une proline (Knighton *et al.*, 1991). Elles peuvent être activées par une multitude de stimuli externes. Dans cette famille, on retrouve les MAP kinases ERK1/2 qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire des cellules intestinales épithéliales, en facilitant l'entrée dans le cycle cellulaire (Pages *et al.*, 1993 ; Lavoie *et al.*, 1996), les MAP kinases p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase), toutes deux étant reconnues comme des kinases de stress (Kyriakis et Avruch, 2001). La MAP kinase p38 α joue un rôle dans la différenciation des entérocytes (Houde *et al.*, 2001). En effet, la forme phosphorylée active est retrouvée dans le noyau des cellules différenciées de la villosité. De plus, la phosphorylation de Cdx2 par la MAP kinase p38 α contrôle positivement l'activité transcriptionnelle de Cdx2, un régulateur important de la différenciation et de la prolifération épithéliale intestinale (Houde *et al.*, 2001). L'activation soutenue de la MAP kinase p38 est aussi nécessaire à la différenciation des neurones (Shi *et al.*, 2005). Enfin la MAP kinase p38 α est aussi impliquée dans la réponse inflammatoire des cellules intestinales en phosphorylant, entre autres, le facteur de transcription C/EBP δ et en augmentant sa capacité de transactivation (Svotelis *et al.*, 2005). Un des objectifs de ce projet consistait à d'identifier le site de liaison et le site de phosphorylation de la MAP kinase p38 α sur Cdx2.

Nous avons identifié par mutagenèse dirigée, par essais de phosphorylation *in vitro* et par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la MAP kinase p38, le site de phosphorylation de Cdx2 entre les acides aminés 139-180 du domaine de transactivation acides aminés 1-180 (Trinh *et al.*, 1999). Une mutation en alanine de la sérine 156 a diminué le niveau de phosphorylation de base par rapport à celui du Cdx2 de type sauvage, affectant la sensibilité à l'inhibiteur de la MAP kinase p38, le SB203580. Ce résultat montre que la sérine 156 est un des sites de phosphorylation de la MAP kinase p38; cependant, il faut mentionner que le mutant S156A est toujours sensible à l'inhibiteur de la MAP kinase p38, à un degré moindre, suggérant l'implication d'autres kinases. Il est possible que l'inactivation de la sérine 156 favorise l'utilisation d'un autre site de phosphorylation. Néanmoins, la présence de la sérine 156 semble nécessaire pour une activité transcriptionnelle maximale de Cdx2 au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase. En plus de la sérine 156 que nous avons identifiée, d'autres groupes de recherche ont déterminé des sites de phosphorylation contrôlant l'activité de Cdx2. Par exemple, la sérine 60 de Cdx2 pourrait être phosphorylée par les MAP kinases ERK1/2 dans les cellules intestinales épithéliales non-différenciées, menant à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Cdx2 (Rings *et al.*, 2001). Nous avons aussi montré récemment que la phosphorylation de Cdx2 par la kinase cdk2 entraînait sa dégradation au protéasome (Boulanger *et al.*, 2005). Une équipe a aussi récemment suggéré qu'une série de 4 sérines retrouvées dans la portion C-terminale de Cdx2 pouvait être une cible de phosphorylation par la kinase cdk2, et entraînerait aussi la dégradation de celui-ci par

le protéasome dans les cellules prolifératives de la crypte (Gross *et al.*, 2005), comme démontré dans notre laboratoire.

Nous avons aussi identifié la région entre les acides aminés 61-76 comme étant le site de liaison de la MAP kinase p38 α . Cette région ne possède aucune similarité avec les sites de liaison communément caractérisés par les MAP kinases (LXL) (Sharrocks *et al.*, 2000). Une délétion des acides aminés 61 à 76 diminue fortement le niveau de phosphorylation de base de Cdx2. Si l'on regarde plus précisément, on remarque que cette délétion élimine la proline en aval de la sérine 60. Puisque cette sérine est reconnue pour être phosphorylée, cette diminution de phosphorylation peut être causée d'une part, par la perte de la liaison et de la phosphorylation par la MAP kinase p38 α mais aussi, en partie, par la perte de phosphorylation par les MAP kinases ERK1/2 au niveau de la sérine 60 (Rings *et al.*, 2001). De manière surprenante, cette délétion n'affecte pas la capacité de transactivation de Cdx2 sur le promoteur de la sucrase-isomaltase, mais diminue la capacité de transactivation du promoteur de la lactase phlorizine hydrolase. Ce résultat obtenu avec le promoteur de la sucrase-isomaltase pourrait être dû à une annulation d'effet contraire. En effet, la délétion des acides aminés 61-76 pourrait empêcher l'effet positif sur la capacité de transactivation de Cdx2 apporté par la liaison et la phosphorylation par la MAP kinase p38 α , mais bloquerait aussi l'effet négatif apporté par la phosphorylation de la sérine 60 par les MAP kinases ERK1/2, tel que suggéré par Rings *et al.* (2001). En ce qui concerne le résultat obtenu avec le promoteur de la lactase phlorizine hydrolase, ceci pourrait s'expliquer par une coopération de différents facteurs de transcription pour

stimuler l'activité de son promoteur. Par exemple, au niveau du promoteur de la lactase, le facteur de transcription PDX-1 est impliqué dans son activation tandis qu'il n'est pas requis au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase (Wang *et al.*, 2004). Nous avons aussi récemment identifié un site de liaison de la kinase cdk2 au niveau des acides aminés RNL (162-164) : cette interaction est aussi importante dans la phosphorylation de Cdx2 par cdk2 (Boulanger *et al.*, 2005). Ce site permet à la kinase cdk2 de phosphoryler Cdx2 dans les cellules intestinales épithéliales non-différenciées et prolifératives, entraînant la sortie de Cdx2 du noyau et sa dégradation au protéasome (Boulanger *et al.*, 2005).

Ainsi, l'activité transcriptionnelle de Cdx2 pourrait être inhibée dans les cellules prolifératives de la crypte de deux façons : soit par phosphorylation de la sérine 60 par les MAP kinases ERK1/2 qui réduirait la capacité de transactivation de Cdx2 (Rings *et al.*, 2001), soit par phosphorylation de la région C-terminale de Cdx2, par la kinase cdk2 qui dirigerait Cdx2 vers une dégradation par le protéasome (Boulanger *et al.*, 2005 ; Gross *et al.*, 2005). L'activité des MAP kinases ERK1/2 et de cdk2 diminue grandement dans les cellules en différenciation ou différenciées corrélant avec un arrêt du cycle cellulaire (Aliaga *et al.*, 1999 ; Deschenes *et al.*, 2001). La MAP kinase p38 α étant activée dans les cellules différenciées, par la suite lierait Cdx2 dans la portion 61-76 de la protéine et phosphorylerait la sérine 156, pour permettre une activité de transactivation maximale sur le promoteur de gènes cibles.

2. Cdx2 et la différenciation épithéliale intestinale.

Le facteur de transcription Cdx2 joue un rôle important dans le développement, la différenciation, le maintien et l'homéostasie des cellules intestinales épithéliales (Silberg *et al.*, 2000 ; Hinoi *et al.*, 2002 ; Hinoi *et al.*, 2005). Le gène Cdx2 est exprimé dans les stades primaires de développement chez l'embryon de souris. Par contre chez l'adulte, ce gène est seulement exprimé dans l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon avec un niveau indétectable dans les autres tissus (James *et al.*, 1994). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du développement intestinal par Cdx2 ont intéressé les chercheurs depuis plusieurs années. Cependant, un nombre limité de gènes cibles contrôlés par Cdx2 a été identifié. Parmi ces gènes, on retrouve : la sucrase-isomaltase (Suh *et al.*, 1994), le glucagon (Jin *et al.*, 1997), l'anhydrase carbonique 1 (Drummond *et al.*, 1998), la calbindin-D9K (Colnot *et al.*, 1998), le récepteur de la vitamine D (Yamamoto *et al.*, 1999), la lactase (Fang *et al.*, 2000), la guanylyl cyclase C (Park *et al.*, 2000), le clusterin (Suh *et al.*, 2001), le facteur gut-enriched Krüppel-like (Dang *et al.*, 2001), la claudin-2 (Sakaguchi *et al.*, 2002), HBEGF (Uesaka *et al.*, 2002), MUC2 (Yamamoto *et al.*, 2003) et Cdx2 lui-même via une boucle d'autorégulation (Xu *et al.*, 1999). De plus, la surexpression de Cdx2 dans les cellules IEC-6 produit un arrêt de prolifération suivi d'une période de croissance et l'établissement d'une culture plus dense que celle des cellules n'exprimant pas Cdx2. On observe la formation de structures multicellulaires, un épithélium cylindrique avec une morphologie apparente à celle de l'épithélium intestinal et l'expression de marqueurs de différenciation comme la sucrase-isomaltase (Suh et Traber, 1996). Afin de mieux comprendre le rôle de Cdx2 dans la

différenciation épithéliale intestinale, nous avons établi une lignée cellulaire épithéliale intestinale surexprimant de manière stable et constitutive Cdx3. Nous avons réalisé des micropuces ADN, à partir de ces cellules nouvellement confluentes, pour nous permettre d'identifier de nouvelles cibles de Cdx2. Nous avons identifié les classes de gènes modulés positivement par Cdx2. Nous allons plus particulièrement discuter de certaines cibles pouvant être impliquées dans la modulation de certains aspects de la différenciation entérocytaire par Cdx2.

3. Croissance et homéostasie cellulaire

Depuis plusieurs années, différents travaux ont démontré l'implication de Cdx2 dans le développement de l'intestin, l'homéostasie de l'épithélium intestinal et le processus de différenciation. Plusieurs gènes de la classe « croissance et homéostasie cellulaire » sont augmentés par Cdx2. Parmi ces gènes, on retrouve les gènes codant pour l'héphaestin. L'héphaestin est une ferroxidase dépendante du cuivre intestinal qui agit de concert avec la ferroportine pour médier le relâchement du fer des entérocytes (Wessling-Resnick, 2006). L'expression de l'héphaestin est augmentée, ce qui est en accord avec les travaux récents montrant que l'héphaestin est une cible de Cdx2 dans les cellules intestinales épithéliales humaines (Hinoi *et al.*, 2005).

Une autre cible de Cdx2 identifiée est la lipopolysaccharide binding protein (LBP). La LBP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation qui est produite lors d'infections bactériennes de type gram-négatives et qui lie la toxine produite par ces bactéries, le lipopolysaccharide (LPS). La LBP est exprimée au niveau de la

membrane apicale des cellules intestinales et est augmentée lors d'une exposition au LPS (Vreugdenhil *et al.*, 2000), particulièrement dans les cellules différenciées, ce qui coïncide avec celle de Cdx2. Nos résultats récents ont montré que Cdx2 lierait directement le promoteur de la LBP et l'activerait (non montré). Donc, la régulation dépendante de Cdx2 du gène de la LBP pourrait être impliquée dans la réponse différente des cellules épithéliales intestinales de l'axe crypte-villosité (Gendron *et al.*, article en préparation).

Une des caractéristiques de l'épithélium intestinal est sa capacité à absorber et métaboliser des lipides. Une enzyme importante, la phospholipase A2 du groupe IIA est augmentée dans les cellules surexprimant Cdx3. La phospholipase A2 hydrolyse les phospholipides, favorisant ainsi la relâche d'acides gras libres, de lysophospholipides et d'acides arachidonique, un précurseur de la grande famille pro-inflammatoire des éicosanoides qui comprend les prostaglandines et les leukotriènes (Reid, 2005). Dans cette voie, on retrouve aussi la cyclooxygénase-2 (COX-2), qui est une enzyme essentielle pour la synthèse des prostaglandines. De plus, ses propriétés anti-bactériennes (Buckland et Wilton, 2000) lui confèrent un rôle dans la réponse inflammatoire au même titre que la LBP (Murakami *et al.*, 1996 ; Murakami *et al.*, 1997). L'activité de la phospholipase A2 est très forte au niveau de l'intestin normal (Markova *et al.*, 2005). Les souris APC^{min} ont une mutation dans le gène APC (adenomatous polyposis coli) qui entraîne la formation de polypes. Il a été démontré que le locus *Mom1* (modifier of min), qui encode la phospholipase A2 groupe IIA, diminue le nombre de polypes développés chez la souris min : les souris APC^{min}

hétérozygotes pour *Mom1* (allèle normal non-muté), qui expriment un certain niveau de phospholipase A2 groupe IIA, présentent 2 fois moins de polypes tandis que les souris homozygotes pour *Mom1*, qui expriment un plus fort niveau de phospholipase A2 groupe IIA, en présentent 4 fois moins. Un croisement de ces souris avec l'allèle muté, qui n'exprime plus la phospholipase A2 groupe IIA, aux souris APC^{min}, entraîne une augmentation du nombre de polypes (MacPhee *et al.*, 1995 ; Gould *et al.*, 1996 ; Cormier *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que la phospholipase A2 groupe IIA protège de l'initiation de la tumorigénèse. On pourrait suggérer que l'effet suppresseur de tumeur de Cdx2 pourrait en partie être dû à sa capacité d'induire l'expression de la phospholipase A2 groupe IIA, étant Cdx2 connu pour être un gène suppresseur de tumeur. L'induction de la phospholipase A2 groupe IIA pourrait jouer un rôle dans l'effet suppresseur de tumeur de Cdx2.

Un autre gène cible que nous avons identifié et qui est induit de 1.5 fois dans les cellules surexprimant Cdx2, est le gène de la furine, une convertase impliquée dans la maturation post-traductionnelle de plusieurs protéines dans l'appareil de Golgi. La furine est une sérine endoprotéase dépendante du calcium. Parmi les cibles de la furine on retrouve plusieurs pro-protéines comme le TGF- β 1 (Dubois *et al.*, 2001), la BMP-4 (Degnin *et al.*, 2004), le récepteur de l'insuline (Bass *et al.*, 2000), le récepteur de Notch1 (Logeat *et al.*, 1998), la cadhérine E (Posthaus *et al.*, 1998 ; Posthaus *et al.*, 2003), la lactase phlorizine hydrolase (Mesonero *et al.*, 1998) ainsi que plusieurs métalloprotéinases (Pei et Weiss, 1995 ; Yana et Weiss, 2000). Nos résultats, non montrés ici, ont démontré que Cdx2 lie et transactive le promoteur P1 de

la furine. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de la furine diminue l'activité de la lactase phlorizine hydrolase, une enzyme importante retrouvée dans les entérocytes différenciés qui diminue fortement la maturation de la cadhérine E. Une inhibition prolongée de l'activité de la furine dans les cellules Caco2/15 réduit la polarisation cellulaire ainsi que la formation de la bordure en brosse (Gendron *et al.*, 2006). Ainsi la furine pourrait en partie médier les effets de Cdx2 dans la différenciation entérocytaire.

Comparativement à une autre équipe ayant réalisé le même genre d'expérience, nous n'avons pas observé d'induction des gènes de la voie des Notch (Uesaka *et al.*, 2004). Ceci pourrait être dû à différentes raisons comme le type ou la provenance des micropuce qui ne sont pas les mêmes. Même si nous avons utilisé la même lignée IEC-6, nous avons exprimé Cdx3 de façon constitutive et non inductible. De plus, nous avons isolé les extraits d'ARN à partir de cellules nouvellement confluentes tandis que l'étude réalisée par Uesaka et al. ne fournit aucune précision sur le stade de confluence des cellules ayant servi à la préparation des extraits.

4. Métabolisme des lipides

Une autre catégorie de gènes augmentés par la surexpression de Cdx3 dans les cellules IEC-6 sont les apolipoprotéines. Nous avons observé une induction de 12.6 fois pour le gène de l'apolipoprotéine A-I et une induction de 11.9 fois pour l'apolipoprotéine E. L'apolipoprotéine A-I fait partie des apolipoprotéines majoritairement retrouvées au niveau des *high density lipopolyprotein* (HDL). Elle est

impliquée dans le transport du cholestérol et elle joue un rôle dans la stabilisation des structures lipoprotéiques en interagissant avec des récepteurs de surface cellulaire et en agissant comme puissant activateur d'enzymes plasmatiques (Levy *et al.*, 2000). L'apolipoprotéine E est aussi augmentée. Celle-ci est enrichie dans le *very low density lipopolyprotein* (VLDL) et pourrait avoir un effet anti-prolifératif dans les cellules endothéliales tumorales (Browning *et al.*, 1994 ; Vogel *et al.*, 1994 ; Niemi *et al.*, 2002).

Généralement, ces gènes sont des cibles transcriptionnelles bien connues du facteur de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor 4* (HNF4). La protéine HNF4 α est un membre de la famille des récepteurs nucléaires. Elle est notamment exprimée dans le foie et l'intestin. De nombreuses études ont montré l'implication de HNF4 α 1 dans le contrôle de la différenciation hépatocytaire ainsi que dans le contrôle de nombreuses voies métaboliques. Particulièrement, certaines études ont montré que HNF4 α est un gène clé dans le contrôle du métabolisme des lipides, notamment via le contrôle de l'expression des apolipoprotéines. Une étude préliminaire effectuée dans nos cellules IEC-CDX3 démontre effectivement que l'expression de HNF4 est induite dans ces cellules par rapport aux cellules contrôles (non montré). À l'inverse, les cellules IEC-6 surexprimant HNF4 n'expriment pas Cdx2 (Delabre *et al.*, manuscrit en préparation). Par conséquent, il est probable que Cdx2 induise indirectement l'expression d'un sous-groupe de gènes par l'intermédiaire de HNF4.

5. Adhésion cellulaire.

L'épithélium cylindrique de l'intestin grêle et du côlon est en continuel renouvellement. Cet épithélium hautement spécialisé peut agir comme barrière spécialisée dans l'absorption des nutriments, des sels et de l'eau (Kraehenbuhl *et al.*, 1997). L'épithélium est polarisé avec des microvillosités à sa portion apicale, pour augmenter la surface d'absorption et des jonctions entre cellules pour former une barrière (Kraehenbuhl *et al.*, 1997 ; Thomson *et al.*, 2001). Les protéines à homéodomaine Cdx1 et Cdx2 contrôlent l'expression de gènes spécifiques à l'intestin adulte (Suh *et al.*, 1994 ; Taylor *et al.*, 1997a ; Freund *et al.*, 1998). Dans les cellules IEC-6, l'expression de Cdx1 et Cdx2 induit la polarisation, la morphologie cylindrique ainsi que la formation de jonctions adhérentes de type serrées ou desmosomes (Suh et Traber, 1996 ; Soubeyran *et al.*, 1999). L'expression de Cdx2 semble augmenter les niveaux d'ARN de la cadhérine E dans les cellules intestinales épithéliales humaines Caco-2-TC7 (Lorentz *et al.*, 1997). Récemment, la surexpression de Cdx1 et Cdx2 dans la lignée COLO 205, une lignée incapable d'engager des interactions normales entre cellules, a restauré cette capacité d'adhésion en induisant, entre autre, l'expression de la E-cadhérine (Keller *et al.*, 2004). La cadhérine E est la cadhérine qui est retrouvée dans presque tous les épithéliums incluant l'épithélium intestinal. Il a été établi que l'expression et l'activité d'adhésion de la cadhérine E sont des facteurs importants dans la régulation de l'adhésion cellulaire, le compactage des membranes, la polarisation cellulaire et la prolifération dans l'épithélium intestinal. Malgré une augmentation de l'adhésion cellulaire suite à l'expression de Cdx3, nous n'avons pas observé de modulations significatives du gène

encodant pour la E-cadhérine dans les cellules surexprimant Cdx3. Par contre, le gène encodant pour la cadhérine-2 ou N-cadhérine est induit de 2 fois. L'importance des cadhérines a été premièrement démontrée par Hermiston et Gordon en 1995 où ils ont surexprimé une forme chimérique de la N-cadhérine, qui agit comme mutant dominant négatif, et ce spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Ils ont observé que les souris surexprimant ce mutant développaient une forme d'inflammation intestinale semblable à celle observée lors de la maladie de Crohn chez l'humain. De plus, la surexpression de ce mutant provoque également des perturbations importantes de la prolifération, de la migration et de la mort cellulaire, menant à la formation d'adénomes. Ce même groupe a forcé l'expression de la cadhérine E au niveau de l'épithélium intestinal et ils ont observé qu'avec l'augmentation de la cadhérine E il en suivait une augmentation de la β -caténine. Parmi les autres observations, un ralentissement de la migration des entérocytes mais aucune modification de la prolifération et de l'apoptose au niveau des cryptes fut rapporté par Hermiston *et al.*, (1996). À la vue du rôle important de la présence des cadhérines au niveau de l'homéostasie intestinale, il est facile de comprendre pourquoi celles-ci sont induites par Cdx2. Celui-ci est connu pour avoir un rôle important dans l'expression de protéines des jonctions cellulaire et pour avoir un effet sur la prolifération cellulaire.

La surexpression de Cdx3 dans les cellules IEC-6 permet à celles-ci de démarrer une différenciation cellulaire. Nous avons montré que l'adhésion des cellules IEC-6 entre elles et à du plastique non-traité était augmentée suite à l'expression de Cdx3. Nous avons identifié la galectine-4 comme étant un gène induit par Cdx3, tel que déterminé

par les études d'expression et par immunobuvardage de type western. Comme il a été démontré, l'expression de Cdx2 augmente la capacité d'adhésion des cellules en augmentant également l'expression de la cadhérine E et il est possible que la galectine-4 collabore aussi dans ce sens (Keller *et al.*, 2004). La cinétique d'expression de la galectine-4 est parallèle à celle de Cdx2 dans les cellules Caco-2/15. Dans les cellules surexprimant Cdx3, on retrouve la galectine-4 distribuée uniformément dans la cellule mais avec une plus forte concentration au pourtour de la cellule. La galectine-4 promouvoit l'adhésion cellulaire dans les cellules d'adénocarcinome de côlon humain CCK 81 (Ideo *et al.*, 2005). La galectine-4 fait partie de la famille des lectines. Les galectines reconnaissent et lient le β -galactose via une séquence consensus retrouvée dans leur domaine CRD (Carbohydrate-recognition domain) (Barondes *et al.*, 1994). Contrairement aux autres galectines, la galectine-4 possède 2 domaines CRD qui lui confèrent sa capacité de promouvoir l'adhésion cellulaire. Il se pourrait donc que la galectine-4 favorise l'adhésion cellulaire des cellules IEC-6. L'inactivation de la galectine-4 par RNAi pourrait nous montrer l'importance relative de celle-ci dans l'adhésion des cellules IEC-6 surexprimant Cdx3.

La galectine-4 a été retrouvée autant dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules IEC-CDX3, avec une localisation analogue à celle des galectines qui peuvent se retrouver dans le cytoplasme, dans le noyau et peuvent être sécrétées de manière non-classique (Cooper et Barondes, 1990 ; Hughes, 1999 ; Liu *et al.*, 2002). Une caractéristique importante de la galectine-4 intestinale est d'être retrouvée dans les

radeaux lipidiques. En effet, la galectine-4 est localisée au niveau des fractions de radeaux lipidiques de la bordure en brosse des cellules intestinales épithéliales ainsi que dans les cellules HT-29 (Hansen *et al.*, 2001 ; Braccia *et al.*, 2003 ; Delacour *et al.*, 2005). Un des rôles proposés des radeaux lipidiques dans les entérocytes est de permettre le transport vers la membrane apicale de la cellule. Les radeaux lipidiques sont des vésicules très riches en glycosphingolipides et en cholestérol, vésicules qui transportent du réseau trans-golgi vers la région apicale (Schuck et Simons, 2004 ; Simons et Ikonen, 1997). Les radeaux lipidiques contiennent aussi plusieurs protéines incluant des enzymes de la digestion comme l'aminopeptidase N et la sucrase-isomaltase, la phosphatase alcaline et la galectine-4 (Danielsen *et al.*, 1995 ; Mirre *et al.*, 1996 ; Alfalah *et al.*, 1999). Nous avons démontré une augmentation du niveau de galectine-4 dans les radeaux lipidiques selon le temps de confluence des cellules IEC-CDX3, suggérant le développement de radeaux lipidiques comme ceux typiquement retrouvés au niveau de la portion apicale des cellules différenciées de l'intestin. La galectine-4 peut aussi stabiliser les radeaux lipidiques. De façon intéressante, alors que nous n'avons détecté aucune activité sucrase-isomaltase aux stades étudiés, une activité pour la phosphatase alcaline a été spécifiquement retrouvée dans les radeaux lipidiques des cellules IEC-CDX3, contrairement à ceux des cellules IEC-Puro. Les résultats démontrent que Cdx2 permet le développement de radeaux lipidiques comme ceux typiquement retrouvés au niveau de la portion apicale des cellules différenciées de l'intestin et entraîne une relocalisation de protéines associées à ceux-ci.

Perspectives et conclusion

Pendant mes travaux, j'ai démontré que la MAP kinase p38 lie les acides aminés 61-76 de Cdx2 et que la perte de cette région diminue le niveau de phosphorylation de Cdx2. De plus, cette délétion entraîne une diminution de la capacité de transactivation de Cdx2 au niveau du promoteur de la lactase phlorizine hydrolase. J'ai aussi démontré que la sérine 156 est phosphorylée par la MAP kinase p38. Sa mutation entraîne une diminution de phosphorylation de Cdx2, une diminution de la capacité de transactivation de Cdx2 au niveau du promoteur de la sucrase-isomaltase et rend celui-ci moins sensible à l'inhibiteur spécifique de la MAP kinase p38, le SB203580.

Il serait intéressant d'identifier précisément les acides aminés dans la région 61-76 qui sont vraiment importants pour l'interaction avec la MAP kinase p38, puisque ce site n'est comparable à aucune séquence consensus de liaison pour cette MAP kinase. De plus, il serait intéressant de vérifier le phénotype apporté par la perte de liaison de la MAP kinase p38 sur Cdx2 en surexprimant ce mutant, puisqu'il a été démontré que l'activation de la MAP kinase p38 est importante pour la différenciation des cellules intestinales épithéliales et pour la capacité de transactivation de Cdx2 (Houde *et al.*, 2001). En ce qui concerne la phosphorylation de Cdx2 par la MAP kinase p38, puisque la mutation de la sérine 156 entraîne une diminution de la phosphorylation mais que Cdx2 conserve toujours une sensibilité à l'inhibiteur de la MAP kinase p38, identifier les autres sites de phosphorylation serait important pour bien comprendre le mécanisme d'activation de Cdx2 par la MAP kinase p38. L'inactivation de plusieurs

sérines cibles de la MAP kinase p38 serait nécessaire. En plus de la sérine 156, une combinaison de mutations des sérines 33, 60 et 99 pourrait être envisagée.

Nous avons aussi démontré que l'expression de Cdx3 dans les cellules IEC-6 induit plusieurs gènes impliqués dans différents processus. Parmi ceux-ci, nous avons identifié la galectine-4. Celle-ci est capable de promouvoir l'adhésion entre les cellules et avec la matrice. Ceci est très intéressant, puisque nos observations ont démontré une plus grande capacité d'adhésion entre les cellules et avec le plastique non-traité dans les cellules surexprimant Cdx3. Il a déjà été démontré que l'expression de Cdx1 et Cdx2 favorise l'adhésion via la E-cadhérine, mais la galectine-4 pourrait avoir un rôle complémentaire à ce niveau (Keller *et al.*, 2004). Il est aussi connu que la galectine-4 stabilise les radeaux lipidiques et joue un rôle dans leur ciblage au niveau de la membrane apicale dans les entérocytes. J'ai démontré que l'expression de la galectine-4 suit parfaitement l'expression de Cdx2 dans les cellules Caco-2/15 durant les différents stades de confluence et qu'elle est retrouvée spécifiquement dans les cellules IEC-6 surexprimant Cdx3, au niveau des radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques des cellules surexprimant Cdx3 contiennent la phosphatase alcaline, une enzyme retrouvée et maturée dans ceux-ci.

En ce qui concerne la galectine-4, il serait intéressant de vérifier si Cdx2 induit directement ou non la galectine-4, par exemple par l'intermédiaire d'autre facteur de transcription tel que HNF4. Il faudrait vérifier si la galectine-4 est sécrétée et ainsi, si elle favorise les interactions cellule-cellule. L'inactivation de la galectine-4 par RNAi

ou la surexpression de la galectine-4 dans les cellules IEC-6, pourrait nous indiquer l'importance de la galectine-4 dans les processus d'adhésion dépendant de Cdx2 ou dans le processus de différenciation entérocytaire dépendant de Cdx2.

Étant donné l'effet de Cdx2 sur la spécialisation de radeaux lipidiques comme ceux observés dans la portion apicale des cellules de la villosité, il pourrait être important de vérifier la composition de ceux-ci en lipides et en protéines cibles. La concentration en sphingolipides et en glycoprotéines serait intéressante à vérifier, puisque celles-ci sont impliquées dans le mécanisme servant à cibler les radeaux lipidiques au niveau de la membrane apicale avec la galectine-4. Il a été démontré que la galectine-4 est impliquée dans le ciblage apical des radeaux lipidiques dans les cellules HT-29, puisque la diminution de son expression à l'aide d'un RNAi inhibe le transport apical (Delacour *et al.*, 2005).

Finalement, nos études nous ont permis d'identifier le site d'interaction et de phosphorylation de la MAP kinase p38 sur Cdx2. De plus, nous avons identifié plusieurs gènes induits par l'expression de Cdx3 dans les cellules épithéliales intestinales, ce qui nous permet de mieux comprendre le mécanisme de différenciation cellulaire des cellules épithéliales intestinales, ainsi que le rôle joué par Cdx2 dans ce processus.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mes deux directeurs de recherche, la Dre Nathalie Rivard et le Dr. Claude Asselin, pour m'avoir accueilli de façon si chaleureuse et cordiale dans leurs laboratoires. Je tiens à les remercier pour m'avoir soutenu, encouragé et conseillé durant tout le temps de maîtrise, mais surtout d'avoir cru en moi. Je me rappellerai toujours les conversations et toutes les informations scientifiques que nous avons partagées. Je voudrais aussi remercier le Dr. Claude Asselin pour m'avoir initié à la recherche fondamentale en biologie moléculaire et la Dre Nathalie Rivard pour toute l'information et l'aide en biologie cellulaire.

J'aimerais bien sûr remercier mes collègues de laboratoire Mylène Blais et Antoine Désilets qui furent les premières personnes que j'ai rencontrées en arrivant et avec qui j'ai beaucoup appris sur les techniques utilisées dans le laboratoire. Je voudrais aussi remercier les collègues de travail du laboratoire Asselin : Andréanne Cartier, Gérald Bernatchez, Jean-François Delabre, Geneviève Doyon, Ionela Gheorghiu, Mariana Ghinet, Dominic Rousseau, Évelyne Roy, Amy Sotelis et Naomie Turgeon ainsi que les stagiaires Marie Bonnard, Jérôme Barbier, Annie Douillette, Noémie Juare, Raphaël Paris, Marie Perrin, Anthony Rémillard, Patrick St-Pierre et Caroline Valiquette, et du laboratoire Rivard : Dre Laetitia Alvarez, Marie-Josée Boucher, Jim Boulanger, Véronique Durand, Hugo Garneau, Dr. Fernand-Pierre Gendron, Marie-Josée Lacroix, Jean Lainé, Patrick Laprise, Étienne Lemieux, Marie-Christine Paquin, Mélanie Simoneau et Anne Vézina. Je vous remercie tous pour vos conseils ainsi que pour votre compagnie autant côté social que travail.

Je tiens à remercier tous les autres étudiants du département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, les professeurs et le personnel de soutien. Je voudrais également remercier les évaluateurs de ce mémoire, Dr. Claude Asselin, Dr. François Boudreau, Dr. Sylvain Guérin et Dre Nathalie Rivard pour avoir pris le temps de lire et de corriger mon travail.

Je tiens finalement à remercier particulièrement ma famille pour m'avoir toujours soutenu durant toutes ces années et surtout pour leur soutien amical et affectif. Je voudrais aussi remercier mes amis : Caroline pour son fort soutien moral et amical, et Hugo pour toutes nos bonnes discussions scientifiques et non scientifiques.

Bibliographie

- Ahn N.G., Weiel J.E., Chan C.P. et Krebs E.G. (1990) Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.*, 265 : 11487-11494.
- Alfalah M., Jacob R., Preuss U., Zimmer K.P., Naim H. and Naim H.Y. (1999) O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr. Biol.*, 9 : 593-596.
- Aliaga J.C., Deschenes C., Beaulieu J.F., Calvo E.L. and Rivard N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression et differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol.*, 277 : G631-G641.
- Bai Y.Q., Miyake S., Iwai T. et Yuasa Y. (2003) CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene*, 22 : 7942-7949.
- Bai Y.Q., Yamamoto H., Akiyama Y., Tanaka H., Takizawa T., Koike M., Kenji Yagi O., Saitoh K., Takeshita K., Iwai T. et Yuasa Y. (2002) Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. *Cancer Lett.*, 176 : 47-55.
- Barondes S.H., Cooper D.N., Gitt M.A. et Leffler H. (1994) Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 269 : 20807-20810.
- Bass J., Turck C., Rouard M. et Steiner D.F. (2000) Furin-mediated processing in the early secretory pathway : sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 : 11905-11909.
- Batlle E., Henderson J.T., Beghtel H., van den Born M.M., Sancho E., Huls G., Meeldijk J., Robertson J., van de Wetering M., Pawson T. et Clevers H. (2002) Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 111 : 251-263.
- Beck F. (2002) Homeobox genes in gut development. *Gut*, 51 : 450-454.
- Beck F., Chawengsaksophak K., Waring P., Playford R.J. et Furness J.B. (1999) Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96 : 7318-7323.
- Beck F., Erler T., Russell A. et James R. (1995) Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.*, 204 : 219-227.
- Bergmann M., Hart L., Lindsay M., Barnes P.J. et Newton R. (1998) IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-

1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway. *J. Biol. Chem.*, 273 : 6607-6610.

Bienz M. et Clevers H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103 : 311-320.

Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90 : 5889-5892.

Blobe G.C., Schiemann W.P. et Lodish H.F. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.*, 342 : 1350-1358.

Booth C., Brady G. et Potten C.S. (2002) Crowd control in the crypt. *Nat. Med.*, 8 : 1360-1361.

Boucher M.J., Jean D., Vezina A. et Rivard N. (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 286 : G736-G746.

Boucher M.J et Rivard N. (2003) Regulation and role of brush border-associated ERK1/2 in intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311 : 121-128.

Boulanger J., Vezina A., Mongrain S., Boudreau F., Perreault N., Auclair B.A., Laine J., Asselin C. et Rivard N. (2005) Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280 : 18095-18107.

Braccia A., Villani M., Immerdal L., Niels-Christiansen L.L., Nystrom B.T., Hansen G.H. et Danielsen E.M. (2003) Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". *J. Biol. Chem.*, 278 : 15679-15684.

Brondello J.M., McKenzie F.R., Sun H., Tonks N.K. et Pouyssegur J. (1995) Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*, 10 : 1895-1904.

Browning P.J., Roberts D.D., Zabrenetzky V., Bryant J., Kaplan M., Washington R.H., Panet A., Gallo R.C. et Vogel T. (1994) Apolipoprotein E (ApoE), a novel heparin-binding protein inhibits the development of Kaposi's sarcoma-like lesions in BALB/c nu/nu mice. *J. Exp. Med.*, 180 : 1949-1954.

Brunet A., Pages G. et Pouyssegur J. (1994) Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene*, 9 : 3379-3387.

- Buckland A.G. et Wilton D.C. (2000) Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1483 : 199-216.
- Burglin T.R., Finney M., Coulson A. et Ruvkun G. (1989) *Caenorhabditis elegans* has scores of homoeobox-containing genes. *Nature*, 341 : 239-243.
- Cadigan K.M. et Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.*, 11 : 3286-3305.
- Chawengsaksophak K., James R., Hammond V.E., Kontgen F. et Beck F. (1997) Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature*, 386 : 84-87.
- Chomczynski P., Mackey K., Drews R. et Wilfinger W. (1997) DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques*, 22 : 550-553.
- Clatworthy J.P. et Subramanian V. (2001) Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech. Dev.*, 101 : 3-9.
- Colnot S., Romagnolo B., Lambert M., Cluzeaud F., Porteu A., Vandewalle A., Thomasset M., Kahn A. et Perret C. (1998) Intestinal expression of the calbindin-D9K gene in transgenic mice. Requirement for a Cdx2-binding site in a distal activator region. *J. Biol. Chem.*, 273 : 31939-31946.
- Cooper D.N. et Barondes S.H. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.*, 110 : 1681-1691.
- Cormier R.T., Bilger A., Lillich A.J., Halberg R.B., Hong K.H., Gould K.A., Borenstein N., Lander E.S. et Dove W.F. (2000) The Mom1AKR intestinal tumor resistance region consists of Pla2g2a and a locus distal to D4Mit64. *Oncogene*, 19 : 3182-3192.
- Cowley S., Paterson H., Kemp P. et Marshall C.J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, 77 : 841-852.
- Dang D.T., Mahatan C.S., Dang L.H., Agboola I.A. et Yang V.W. (2001) Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene*, 20 : 4884-4890.
- Danielsen E.M., Hansen G.H. et Niels-Christiansen L.L. (1995) Localization and biosynthesis of aminopeptidase N in pig fetal small intestine. *Gastroenterology*, 109 : 1039-1050.
- Davis R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103 : 239-252.

- Degnin C., Jean F., Thomas G. et Christian J.L. (2004) Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol. Biol. Cell.*, 15 : 5012-5020.
- Delacour D., Gouyer V., Zanetta J.P., Drobecq H., Leteurtre E., Grard G., Moreau-Hannedouche O., Maes E., Pons A., Andre S., Le Bivic A., Gabius H.J., Manninen A., Simons K. et Huet G. (2005) Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J. Cell Biol.*, 169 : 491-501.
- Derynck R. et Zhang Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425 : 577-584.
- Derynck R., Zhang Y. et Feng X.H. (1998) Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, 95 : 737-740.
- Derynck R. et Feng X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1333 : F105-50.
- Deschenes C., Vezina A., Beaulieu J.F. et Rivard N. (2001) Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*, 120 : 423-438.
- Desilets A., Gheorghiu I., Yu S.J., Seidman E.G. et Asselin C. (2000) Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276 : 673-679.
- Di Guglielmo M.D., Park J., Schulz S. et Waldman S.A. (2001) Nucleotide requirements for CDX2 binding to the cis promoter element mediating intestine-specific expression of guanylyl cyclase C. *FEBS Lett.*, 507 : 128-132.
- Drummond F., Putt W., Fox M. et Edwards Y.H. (1997) Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene. *Ann. Hum. Genet.*, 61 (Pt 5) : 393-400.
- Drummond F.J., Sowden J., Morrison K. et Edwards Y.H. (1998) Colon carbonic anhydrase 1: transactivation of gene expression by the homeodomain protein Cdx2. *FEBS Lett.*, 423 : 218-222.
- Dubois C.M., Blanchette F., Laprise M.H., Leduc R., Grondin F. et Seidah N.G. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am. J. Pathol.*, 158 : 305-316.
- Duprey P., Chowdhury K., Dressler G.R., Balling R., Simon D., Guenet J.L. et Gruss P. (1988) A mouse gene homologous to the Drosophila gene caudal is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev.*, 2 : 1647-1654.
- Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T. et Miyazono K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I

receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, 276 : 12477-12480.

Eda A., Osawa H., Satoh K., Yanaka I., Kihira K., Ishino Y., Mutoh H. et Sugano K. (2003) Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J. Gastroenterol.*, 38 : 14-22.

Edwards P., Enver T., Hughes S., Gardner R., Martin P., Mombaerts P., Otto W., Partridge T., Pollard J., Raviola E., Semenza G., Shima D., Spiegelman B., Watt F., Weissman I. et Wright N. (2002) *Molecular Biology of The Cell, Histology: The lives and deaths of cells in tissues*. New York : Garland Science, 1274-1276.

Ee H.C., Erler T., Bhathal P.S., Young G.P. et James R.J. (1995) Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 147 : 586-592.

Eferl R. et Wagner E.F. (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.*, 3 : 859-868.

Egan S.E., Giddings B.W., Brooks M.W., Buday L., Sizeland A.M. et Weinberg R.A. (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363 : 45-51.

Eppert K., Scherer S.W., Ozcelik H., Pirone R., Hoodless P., Kim H., Tsui L.C., Bapat B., Gallinger S., Andrulis I.L., Thomsen G.H., Wrana J.L. et Attisano L. (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, 86 : 543-552.

Fang R., Santiago N.A., Olds L.C. et Sibley E. (2000) The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology*, 118 : 115-127.

Fearon E.R. et Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61 : 759-767.

Freund J.N., Domon-Dell C., Kedinger M. et Duluc I. (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem. Cell Biol.*, 76 : 957-969.

Gamer L.W. et Wright C.V. (1993) Murine Cdx-4 bears striking similarities to the Drosophila caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.*, 43 : 71-81.

Gendron F.P., Mongrain S., Laprise P., McMahon S., Dubois C.M., Blais M., Asselin C., et Rivard N. (2006) The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290 : G310-G318.

- German M.S., Wang J., Chadwick R.B. et Rutter W.J. (1992) Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.*, 6 : 2165-2176.
- Gheorghiu I., Deschenes C., Blais M., Boudreau F., Rivard N. et Asselin C. (2001) Role of specific CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 276 : 44331-44337.
- Giles R.H., van Es J.H. et Clevers H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1653 : 1-24.
- Gilles P.N., Fey G. et Chisari F.V. (1992) Tumor necrosis factor alpha negatively regulates hepatitis B virus gene expression in transgenic mice. *J. Virol.*, 66 : 3955-3960.
- Gordon J.I., Schmidt G.H. et Roth K.A. (1992) Studies of intestinal stem cells using normal, chimeric, and transgenic mice. *FASEB J.*, 6 : 3039-3050.
- Gordon J.I. (1989) Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J. Cell Biol.*, 108 : 1187-1194.
- Gould K.A., Dietrich W.F., Borenstein N., Lander E.S. et Dove W.F. (1996) Mom1 is a semi-dominant modifier of intestinal adenoma size and multiplicity in Min/+ mice. *Genetics*, 144 : 1769-1776.
- Grady W.M., Myeroff L.L., Swinler S.E., Rajput A., Thiagalingam S., Lutterbaugh J.D., Neumann A., Brattain M.G., Chang J., Kim S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B., Willson J.K. et Markowitz S. (1999) Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.*, 59 : 320-324.
- Gross I., Lhermitte B., Domon-Dell C., Duluc I., Martin E., Gaididon C., Keding M. et Freund J.N. (2005) Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene*, 24 : 7955-7963.
- Guo R.J., Suh E.R. et Lynch J.P. (2004) The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer. Biol. Ther.*, 3 : 593-601.
- Hansen G.H., Immerdal L., Thorsen E., Niels-Christiansen L.L., Nystrom B.T., Demant E.J. et Danielsen E.M. (2001) Lipid rafts exist as stable cholesterol-independent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. *J. Biol. Chem.*, 276 : 32338-32344.
- He X.C., Zhang J., Tong W.G., Tawfik O., Ross J., Scoville D.H., Tian Q., Zeng X., He X., Wiedemann L.M., Mishina Y. et Li L. (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.*, 36 : 1117-1121.

Hecht A., Torbey C.F., Korsmo H.A. et Olsen W.A. (1997) Regulation of sucrase and lactase in developing rats: role of nuclear factors that bind to two gene regulatory elements. *Gastroenterology*, 112 : 803-812.

Hermiston M.L. et Gordon J.I. (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270: 1203-1206.

Hermiston M.L., Wong M.H. et Gordon J.I. (1996) Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev.* 10 : 986-996.

Hill C.S. (1999) The Smads. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31 : 1249-1254.

Hinoi T., Gesina G., Akyol A., Kuick R., Hanash S., Giordano T.J., Gruber S.B. et Fearon E.R. (2005) CDX2-regulated expression of iron transport protein hephaestin in intestinal and colonic epithelium. *Gastroenterology*, 128 : 946-961.

Hinoi T., Lucas P.C., Kuick R., Hanash S., Cho K.R. et Fearon E.R. (2002) CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology*, 123 : 1565-1577.

Hinoi T., Tani M., Lucas P.C., Caca K., Dunn R.L., Macri E., Loda M., Appelman H.D., Cho K.R. et Fearon E.R. (2001) Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am. J. Pathol.*, 159 : 2239-2248.

Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C. et Rivard N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.*, 276 : 21885-21894.

Hughes R.C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473 : 172-185.

Ideo H., Seko A. et Yamashita K. (2005) Galectin-4 binds to sulfated glycosphingolipids and carcinoembryonic antigen in patches on the cell surface of human colon adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 280 : 4730-4737.

Ip Y.T. et Davis R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10 : 205-219.

James R., Erler T. et Kazenwadel J. (1994) Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.*, 269 : 15229-15237.

Javelaud D. et Mauviel A. (2004) Transforming growth factor-betas: smad signaling and roles in physiopathology. *Pathol. Biol. (Paris)*, 52 : 50-54.

Jin T., Trinh D.K., Wang F. et Drucker D.J. (1997) The caudal homeobox protein cdx-2/3 activates endogenous proglucagon gene expression in InR1-G9 islet cells. *Mol. Endocrinol.*, 11 : 203-209.

Johnstone C.N., White S.J., Tebbutt N.C., Clay F.J., Ernst M., Biggs W.H., Viars C.S., Czekay S., Arden K.C. et Heath J.K. (2002) Analysis of the regulation of the A33 antigen gene reveals intestine-specific mechanisms of gene expression. *J. Biol. Chem.*, 277 : 34531-34539.

Joly J.S., Maury M., Joly C., Duprey P., Boulekbache H. et Condamine H. (1992) Expression of a zebrafish caudal homeobox gene correlates with the establishment of posterior cell lineages at gastrulation. *Differentiation*, 50 : 75-87.

Kaestner K.H., Silberg D.G., Traber P.G. et Schutz G. (1997) The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev.*, 11 : 1583-1595.

Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H. et Wrana J.L. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell*, 6 : 1365-1375.

Keller M.S., Ezaki T., Guo R.J. et Lynch J.P. (2004) Cdx1 or Cdx2 expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human COLO 205 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287 : G104-G114.

Kinzler K.W. et Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87 : 159-170.

Knighton D.R., Zheng J.H., Ten Eyck L.F., Xuong N.H., Taylor S.S. et Sowadski J.M. (1991) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 253 : 414-420.

Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P.J. et Clevers H. (1998) Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.*, 19 : 379-383.

Kotlyarov A., Neininger A., Schubert C., Eckert R., Birchmeier C., Volk H.D. et Gaestel M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat. Cell Biol.*, 1 : 94-97.

Kraehenbuhl J.P., Pringault E. et Neutra M.R. (1997) Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 11 Suppl 3 : 3-8; discussion 8-9.

Kyriakis J.M. et Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.*, 81 : 807-869.

- Lavoie J.N., Rivard N., L'Allemain G. et Pouyssegur J. (1996) A temporal and biochemical link between growth factor-activated MAP kinases, cyclin D1 induction and cell cycle entry. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2 : 49-58.
- Lengyel J.A. et Iwaki D.D. (2002) It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev. Biol.*, 243 : 1-19.
- Levy E., Beaulieu J.F., Delvin E., Seidman E., Yotov W., Basque J.R. et Menard D. (2000) Human crypt intestinal epithelial cells are capable of lipid production, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly. *J. Lipid Res.*, 41 : 12-22.
- Levy V., Marom K., Zins S., Koutsia N., Yelin R. et Fainsod A. (2002) The competence of marginal zone cells to become Spemann's organizer is controlled by Xcad2. *Dev. Biol.*, 248 : 40-51.
- Liu F.T., Patterson R.J. et Wang J.L. (2002) Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572 : 263-273.
- Logeat F., Bessia C., Brou C., LeBail O., Jarriault S., Seidah N.G. et Israel A. (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95 : 8108-8112.
- Lohnes D. (2003) The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays*, 25 : 971-980.
- Lorentz O., Duluc I., Arcangelis A.D., Simon-Assmann P., Keding M. et Freund J.N. (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J. Cell Biol.*, 139 : 1553-1565.
- Lutz M. et Knaus P. (2002) Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell. Signal.*, 14 : 977-988.
- MacPhee M., Chepenik K.P., Liddell R.A., Nelson K.K., Siracusa L.D. et Buchberg AM. (1995) The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell*, 81 : 957-966.
- Malakooti J., Memark V.C., Dudeja P.K. et Ramaswamy K. (2002) Molecular cloning and functional analysis of the human Na(+)/H(+) exchanger NHE3 promoter. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282 : G491-G500.
- Malakooti J., Dahdal R.Y., Dudeja P.K., Layden T.J. et Ramaswamy K. (2001) The human Na(+)/H(+) exchanger NHE2 gene: genomic organization and promoter characterization. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280 : G763-G773.
- Mallo G.V., Rechreche H., Frigerio J.M., Rocha D., Zweibaum A., Lacasa M., Jordan B.R., Dusetti N.J., Dagorn J.C. et Iovanna J.L. (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-

regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 74 : 35-44.

Marais R., Light Y., Paterson H.F., Mason C.S. et Marshall C.J. (1997) Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 272 : 4378-4383.

Marais R., Wynne J. et Treisman R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73 : 381-393.

Markova M., Koratkar R.A., Silverman K.A., Sollars V.E., MacPhee-Pellini M., Walters R., Palazzo J.P., Buchberg A.M., Siracusa L.D. et Farber S.A. (2005) Diversity in secreted PLA2-IIA activity among inbred mouse strains that are resistant or susceptible to Apc Min/+ tumorigenesis. *Oncogene*, 24 : 6450-6458.

Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R.S., Zborowska E., Kinzler K.W. et Vogelstein B. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 268 : 1336-1338.

Marshall M.S. (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.*, 9 : 1311-1318.

Massague J. et Chen Y.G. (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.*, 14 : 627-644.

Meloche S., Seuwen K., Pages G. et Pouyssegur J. (1992) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol. Endocrinol.*, 6 : 845-854.

Merchant J.L., Du M. et Todisco A. (1999) Sp1 phosphorylation by ERK 2 stimulate DNA binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254 : 454-461.

Mesonero J.E., Gloor S.M., and Semenza G. (1998) Processing of human intestinal prolactase to an intermediate form by furin or by a furin-like proprotein convertase. *J. Biol. Chem.*, 273 : 29430-29436.

Mesquita P., Jonckheere N., Almeida R., Ducourouble M.P., Serpa J., Silva E., Pigny P., Silva F.S., Reis C., Silberg D., Van Seuning I. et David L. (2003) Human MUC2 mucin gene is transcriptionally regulated by Cdx homeodomain proteins in gastrointestinal carcinoma cell lines. *J. Biol. Chem.*, 278 : 51549-51556.

Mion F. et Minaire Y. (1996) Physiologie humaine, Digestion. Paris : Pradel, 397-400.

Mirre C., Monlauzeur L., Garcia M., Delgrossi M.H. et Le Bivic A. (1996) Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am. J. Physiol.*, 271 : C887-C894.

- Mitchellmore C., Troelsen J.T., Spodsberg N., Sjöström H. et Norén O. (2000) Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and Hnf1 α mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem. J.*, 346 : 529-535.
- Miyazono K., ten Dijke P. et Heldin C.H. (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.*, 75 : 115-157.
- Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G., Inoue K. et Kudo I. (1997) Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit. Rev. Immunol.*, 17 : 225-283.
- Murakami M., Nakatani Y. et Kudo I. (1996) Type II secretory phospholipase A2 associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation. *J. Biol. Chem.*, 271 : 30041-30051.
- Mutoh H., Fung B.P., Naya F.J., Tsai M.J., Nishitani J. et Leiter A.B. (1997) The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94 : 3560-3564.
- Nick J.A., Avdi N.J., Young S.K., Lehman L.A., McDonald P.P., Frasch S.C., Billstrom M.A., Henson P.M., Johnson G.L. et Worthen G.S. (1999) Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 103 : 851-858.
- Niemi M., Hakkinen T., Karttunen T.J., Eskelinen S., Kervinen K., Savolainen M.J., Lehtola J., Makela J., Yla-Herttuala S. et Kesaniemi Y.A. (2002) Apolipoprotein E and colon cancer. Expression in normal and malignant human intestine and effect on cultured human colonic adenocarcinoma cells. *Eur. J. Intern. Med.*, 13 : 37-43.
- Nishida E. et Gotoh Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 18 : 128-131.
- Ono K. et Han J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.*, 12 : 1-13.
- Pabst O., Zweigerdt R. et Arnold H.H. (1999) Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development*, 126 : 2215-2225.
- Pages G., Lenormand P., L'Allemain G., Chambard J.C., Meloche S. et Pouyssegur J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90 : 8319-8323.
- Park J., Schulz S. et Waldman S.A. (2000) Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology*, 119 : 89-96.

- Patterson A.P., Chen Z., Rubin D.C., Moucadel V., Iovanna J.L., Brewer H.B., Jr. et Eggerman T.L. (2003) Developmental regulation of apolipoprotein B mRNA editing is an autonomous function of small intestine involving homeobox gene Cdx1. *J. Biol. Chem.*, 278 : 7600-7606.
- Pei D. et Weiss S.J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stramelysin-3 zymogen. *Nature*, 375 : 244-247.
- Phillips R.W., Frierson H.F., Jr. et Moskaluk C.A. (2003) Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am. J. Surg. Pathol.*, 27 : 1442-1447.
- Posthaus H., Dubois C.M., Laprise M.N., Grondin F., Suter M.M. et Muller E. (1998) Proprotein cleavage of E-cadherin by furin in baculovirus over-expression system : potential role of other convertases in mammalian cells. *FEBS Lett.*, 438 : 306-310.
- Posthaus H., Dubois C.M. et Muller E. (2003) Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett.*, 536 : 203-208.
- Potten C.S. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol.*, 273 : G253-G257.
- Prinos P., Joseph S., Oh K., Meyer B.I., Gruss P. et Lohnes D. (2001) Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev. Biol.*, 239 : 257-269.
- Pulverer B.J., Kyriakis J.M., Avruch J., Nikolakaki E. et Woodgett J.R. (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353 : 670-674.
- Radtke F. et Clevers H. (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 307 : 1904-1909.
- Reid R.C. (2005) Inhibitors of secretory phospholipase A2 group IIA. *Curr. Med. Chem.*, 12 : 3011-3026.
- Reya T. et Clevers H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434 : 843-850.
- Rhim J.S. (1989) Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. *Anticancer Res.*, 9 : 1345-1365.
- Rings E.H., Boudreau F., Taylor J.K., Moffett J., Suh E.R. et Traber P.G. (2001) Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology*, 121 : 1437-1450.
- Sakaguchi T., Gu X., Golden H.M., Suh E., Rhoads D.B. et Reinecker H.C. (2002) Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J. Biol. Chem.*, 277 : 21361-21370.

- Sancho E., Batlle E. et Clevers H. (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20 : 695-723.
- Satoh K., Mutoh H., Eda A., Yanaka I., Osawa H., Honda S., Kawata H., Kihira K. et Sugano K. (2002) Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: effect of eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 7 : 192-198.
- Schuck S et Simons K. (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell. Sci.*, 117 : 5955-5964.
- Seger R. et Krebs E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9 : 726-735.
- Sharrocks A.D., Yang S.H. et Galanis A. (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.*, 25 : 448-453.
- Shi G.X., Han J. et Andres D.A. (2005) Rin GTPase couples nerve growth factor signaling to p38 and b-Raf/ERK pathways to promote neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.*, 280 : 37599-37609.
- Shi W., Sun C., He B., Xiong W., Shi X., Yao D. et Cao X. (2004) GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.*, 164 : 291-300.
- Shi Y. et Massague J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113 : 685-700.
- Silberg D.G., Swain G.P., Suh E.R. et Traber P.G. (2000) Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology*, 119 : 961-971.
- Silberg D.G., Furth E.E., Taylor J.K., Schuck T., Chiou T. et Traber P.G. (1997) CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology*, 113 : 478-486.
- Simons K. et Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 : 569-572.
- Slice L.W., Chiu T. et Rozengurt E. (2005) Angiotensin II and epidermal growth factor induce cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through small GTPases using distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 280 : 1582-1593.
- Soubeyran P., Andre F., Lissitzky J.C., Mallo G.V., Moucadel V., Roccabianca M., Rechreche H., Marvaldi J., Dikic I., Dagorn J.C. et Iovanna J.L. (1999) Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology*, 117 : 1326-1338.
- Stein B., Kramer M., Rahmsdorf H.J., Ponta H. et Herrlich P. (1989) UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal

repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.*, 63 : 4540-4544.

Subramanian V., Meyer B.I. et Gruss P. (1995) Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell*, 83 : 641-653.

Suh E., Wang Z., Swain G.P., Tenniswood M. et Traber P.G. (2001) Clusterin gene transcription is activated by caudal-related homeobox genes in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280 : G149-G156.

Suh E. et Traber P.G. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 16 : 619-625.

Suh E., Chen L., Taylor J. et Traber P.G. (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 14 : 7340-7351.

Sun H., Charles C.H., Lau L.F. et Tonks N.K. (1993) MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*, 75 : 487-493.

Svetelits A., Doyon G., Bernatchez G., Desilets A., Rivard N. et Asselin C. (2005) IL-1 beta-dependent regulation of C/EBP delta transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328 : 461-470.

Takagi Y., Kohmura H., Futamura M., Kida H., Tanemura H., Shimokawa K. et Saji S. (1996) Somatic alterations of the *DPC4* gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology*, 111 : 1369-1372.

Tamai Y., Nakajima R., Ishikawa T., Takaku K., Seldin M.F. et Taketo M.M. (1999) Colonic hamartoma development by anomalous duplication in *Cdx2* knockout mice. *Cancer Res.*, 59 : 2965-2970.

Taylor J.K., Boll W., Levy T., Suh E., Siang S., Mantei N. et Traber P.G. (1997a) Comparison of intestinal phospholipase A/lysophospholipase and sucrase-isomaltase genes suggest a common structure for enterocyte-specific promoters. *DNA Cell Biol.*, 16 : 1419-1428.

Taylor J.K., Levy T., Suh E.R. et Traber P.G. (1997b) Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res.*, 25 : 2293-2300.

ten Dijke P. et Hill C.S. (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.*, 29 : 265-273.

Thomson A.B., Keelan M., Thiesen A., Clandinin M.T., Ropeleski M.J. et Wild G. (2001) Small bowel review: Part II. *Can. J. Gastroenterol.*, 15 : 446-466.

- Traber P.G., Wu G.D. et Wang W. (1992) Novel DNA-binding proteins regulate intestine-specific transcription of the sucrase-isomaltase gene. *Mol. Cell. Biol.*, 12 : 3614-3627.
- Trinh K.Y., Jin T. et Drucker D.J. (1999) Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein Cdx-3. *J. Biol. Chem.*, 274 : 6011-6019.
- Troelsen J.T., Mitchelmore C., Spodsberg N., Jensen A.M., Noren O. et Sjostrom H. (1997) Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2. *Biochem. J.*, 322 (Pt 3) : 833-838.
- Tung J., Markowitz A.J., Silberg D.G. et Traber P.G. (1997) Developmental expression of SI is regulated in transgenic mice by an evolutionarily conserved promoter. *Am. J. Physiol.*, 273 : G83-G92.
- Uesaka T., Kageyama N. et Watanabe H. (2004) Identifying target genes regulated downstream of Cdx2 by microarray analysis. *J. Mol. Biol.*, 337 : 647-660.
- Uesaka T., Lu H., Katoh O. et Watanabe H. (2002) Heparin-binding EGF-like growth factor gene transcription regulated by Cdx2 in the intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283 : G840-G847.
- Uhlir C.M., Grehan S., Steel D.M., Steinkasserer A. et Whitehead A.S. (1997) Use of the acute serum amyloid A2 (SAA2) gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1 β and TNF- α compared to IL-6. *J. Immunol. Methods.*, 203 : 123-130.
- Vogel T., Guo N.H., Guy R., Drezlich N., Krutzsch H.C., Blake D.A., Panet A. et Roberts D.D. (1994) Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J. Cell. Biochem.*, 54 : 299-308.
- Vojtek A.B. et Cooper J.A. (1995) Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell*, 82 : 527-529.
- Vreugdenhil A.C., Snoek A.M., Greve J.W. et Buurman W.A. (2000) Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. *J. Immunol.*, 165 : 4561-4566.
- Wang Z., Fang R., Olds L.C. et Sibley E. (2004) Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by PDX-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287 : G555-561.
- Wessling-Resnick M (2006) Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 290 : G1-G6.

Xu F., Li H. et Jin T. (1999) Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene Cdx-2/3. *J. Biol. Chem.*, 274 : 34310-34316.

Yamamoto H., Bai Y.Q. et Yuasa Y. (2003) Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300 : 813-818.

Yamamoto H., Miyamoto K., Li B., Taketani Y., Kitano M., Inoue Y., Morita K., Pike J.W. et Takeda E. (1999) The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J. Bone Miner. Res.*, 14 : 240-247.

Yana I. et Wiess S.J. (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol. Biol. Cell.*, 11 : 2387-2401.

Yang Q., Bermingham N.A., Finegold M.J. et Zoghbi H.Y. (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 294 : 2155-2158.

Yoakum G.H., Lechner J.F., Gabrielson E.W., Korba B.E., Malan-Shibley L., Willey J.C., Valerio M.G., Shamsuddin A.M., Trump B.F. et Harris C.C. (1985) Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science*, 227 : 1174-1179.

Zhang Y., Chang C., Gehling D.J., Hemmati-Brivanlou A. et Derynck R. (2001) Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 : 974-979.

Zimmerman C.M. et Padgett R.W. (2000) Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. *Gene*, 249 : 17-30.